

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 087**

51 Int. Cl.:

**A61F 2/00** (2006.01)

**A61L 27/38** (2006.01)

**C12N 5/077** (2010.01)

**A61K 31/715** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2004 E 10183373 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2266500**

54 Título: **Estructura tridimensional de tejido**

30 Prioridad:

**01.08.2003 JP 2003285476**

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

**05.05.2015**

73 Titular/es:

**CELLSEED INC. (100.0%)  
3-61, Haramachi, Shinjuku-ku  
Tokyo 162-0053 , JP**

72 Inventor/es:

**MATSUDA, HIKARU;  
SAWA, YOSHIKI;  
TAKETANI, SATOSHI y  
MIYAGAWA, SHIGERU**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 535 087 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Estructura tridimensional de tejido

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a una estructura tridimensional aplicable al corazón como se define en las reivindicaciones y, más particularmente, a una estructura tridimensional aplicable al corazón que comprende células derivadas de partes de un adulto distintas al corazón. La presente invención también se refiere a un método para producir dicha estructura tridimensional.

**Técnica anterior**

El infarto de miocardio es una lesión irreversible (Ho K.K., Anderson K.M., Kannel W.B., Grossman W., Levy D., Circulation, 1993; 88: 107-115). Las cardiopatías isquémicas son la causa de muerte responsable del 50 % de todas las muertes relacionadas con el sistema cardiovascular y la principal causa de insuficiencia cardiaca congestiva. La mortalidad a 1 año observada en pacientes en los que se ha diagnosticado insuficiencia cardiaca congestiva y, en última instancia, mueren por cardiopatía crónica es del 20 % (American Heart Association, Dallas, Tex: American Heart Association; 2001). La mayoría de las terapias disponibles en la actualidad para los clínicos mejoran significativamente el pronóstico de los pacientes que sufren un infarto agudo de miocardio. La angioplastia y los agentes trombolíticos puede eliminar la causa del infarto agudo de miocardio, aunque el periodo de tiempo desde el inicio de la oclusión hasta la reperfusión determina el grado de lesión irreversible en el miocardio (Ryan T.J., Antman E.M., Brooks N.H., Califf P.M., Hillis L.D., Hiratzka L.F., Rapaport E., Riegel B., Russell R.O., Smith E.E. III Weaver W.D., Gibbons R.J., Alpert J.S., Eagle K.A., Gardner T.J., Garson A. Jr., Gregoratos G., Ryan T.J., Smith S.C. Jr., J. Am. Coll. Cardiol., 1999; 34: 890-911). Ningún agente farmacéutico o tratamiento usado clínicamente tiene eficacia sobre la sustitución de las cicatrices en el miocardio por tejido de contracción funcional. Existe la demanda de una nueva terapia para regenerar los cardiomiocitos normales.

Se ha propuesto la cardiomioplastia como método quirúrgico para mejorar la función del ventrículo izquierdo (VI) de un paciente que sufre insuficiencia cardiaca congestiva, no obstante el efecto de la misma sobre la función cardíaca sigue sin estar claro (Corin W.J., George D.T., Sink J.D. et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 1992, 104:1662-1671; Kratz J.M., Johnson W.S., Mukherjee R. et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 1994, 107:868-878; Carpentier A., Chachques J.C., Lancet, 1985, 8840:1267; y Hagege A. A., Desnos M., Chachques J.C. et al., Preliminary report: follow-up after dynamic cardiomyoplasty, Lancet, 1990, 335:1122-1124). Recientemente, se ha propuesto la implantación de un injerto de corazón modificado biológicamente, donde se usa un armazón biodegradable, como otro nuevo abordaje. No obstante, el injerto apenas se fija al miocardio, lo que tiene como resultado el menos beneficio posible para la mejora de la función cardíaca (Leor J., Etzion S.A., Dar A. et al., Circulation, 2000; 102 [suppl. III] III-56-III-61; y Li R.K., Jia Z.Q., Weisel R.D. et al., Circulation, 1999; 100 [suppl II]: II-63-II-69). La integración histológica y eléctrica del tejido cardíaco modificado biológicamente y un corazón receptor puede ser crucial para la regeneración del miocardio dañado.

Cabe esperar que el reciente desarrollo de la ingeniería de tejidos haga posible la producción de un tejido cardíaco funcional usando una nueva técnica donde láminas celulares se estratifican tridimensionalmente sin ningún sustituto biodegradable para matrices extracelulares (MEC) (Okano T., Yamada N., Sakai H., Sakurai Y., J. Biomed. Mater. Res., 1993; 27:1243-1251). En esta nueva técnica, tanto la adhesión intracelular como las proteínas de adhesión dentro de una monocapa celular cultivada de forma confluyente se mantienen completamente. La MEC endógena que soporta una lámina celular cuya parte de base se ha recogido mediante un método de recogida (Kushida A., Yamato M., Konno C., Kikuchi A., Sakurai Y., Okano T., J. Biomed. Mater. Res., 45:355-362, 1999) desempeña un papel importante como factor de adhesión para la integración en el corazón receptor. Adicionalmente, la lámina de cardiomiocitos es una construcción de corazón 3-D pulsátil que transmite electricidad (Shimizu T., Yamato M., Akutsu T. et al., Circ. Res., Feb 22, 2002, 90(3):e40). No obstante, se desconoce si las láminas de cardiomiocitos conservan o no sus funciones después de su implantación *in vivo*.

El reciente progreso en la ingeniería de tejidos tiene el potencial de proporcionar un tejido funcional implantable que comprende varias células y una matriz extracelular.

La implantación de órganos (por ejemplo, corazón, vaso sanguíneo etc.) usando un tejido exógeno se ve impedida principalmente por rechazos inmunológicos. Los cambios que se producen en aloinjertos y xenoinjertos se describieron por primera vez hace 90 o más años (Carrel A., 1907, J. Exp. Med. 9:226-228; Carrel A., 1912, J. Exp. Med. 9:389-392; Calne R.Y., 1970, Transplant Proc. 2:550; y Auchincloss 1988, Transplantation 46:1). El rechazo a los injertos arteriales conduce patológicamente a un aumento de tamaño (hasta la rotura) u oclusión de los injertos. El primero está causado por la descomposición de matrices extracelulares, mientras que el último se debe a la proliferación de células en un vaso sanguíneo (Uretsky B. F., Mulari S., Reddy S., et al., 1987, Circulation 76:827-834). Dichos injertos a menudo están hechos de materiales no biológicos que producen efectos adversos.

65

Recientemente, la implantación celular ha atraído la atención como terapia usando material biológico. No obstante, la implantación de mioblastos humanos en el corazón infartado tiene los siguientes inconvenientes: 1. Daños y pérdida de células de implantación; 2 lesión tisular del corazón receptor durante la implantación; 3. eficiencia de suministro tisular en el corazón receptor; 4. aparición de arritmia; 5. dificultades para tratar la totalidad del sitio infartado; y similares. Por tanto, no se puede decir que la implantación de células tenga mucho éxito.

Se han desarrollado láminas derivadas de miocardio. Normalmente se requiere miocardio autólogo para la lámina derivada de miocardio en vista de las reacciones inmunológicas. Por tanto, las aplicaciones de la lámina son limitadas.

El resumen y la presentación en la reunión de Memon IA en 2003 se refieren a láminas de mioblastos autólogos que regeneran el miocardio alterado.

La publicación de Memon IA en el Circulation Journal en 2003 informa que una lámina de mioblasto de ingeniería tisular mejora el rendimiento cardíaco.

De acuerdo con lo anterior, existe una gran demanda de un tejido protésico, una estructura tridimensional o una lámina capaz de aguantar las operaciones de implantación, usándose en operaciones reales y produciéndose mediante cultivo.

### **Divulgación de la invención**

Un objeto de la presente invención es proporcionar un tejido o lámina protésico capaz de aguantar las operaciones de implantación, usándose en las operaciones reales y produciéndose mediante cultivo. Otro objeto de la presente invención es proporcionar una nueva terapia, que es una alternativa a la terapia celular. La presente invención está dirigida particularmente a la producción de un tejido protésico que comprende células derivadas de otras partes distintas al miocardio, que pueden aguantar operaciones de implantación.

Los objetos descritos anteriormente de la presente invención se consiguen proporcionando una estructura tridimensional que comprende células derivadas de partes distintas al miocardio. Los objetos de la presente invención se consiguieron parcialmente encontrando que cultivando las células en condiciones de cultivo específicas, las células se organizan inesperadamente en un tejido y el tejido protésico resultante es capaz de desprenderse de las placas de cultivo.

La presente invención también se consiguió hallando inesperadamente que una estructura tridimensional que comprende células derivadas de otras partes distintas al miocardio puede funcionar de un modo similar al del miocardio.

Por tanto, la presente invención proporciona lo siguiente:

1. Una estructura tridimensional aplicable al corazón, que comprende una célula madre mesenquimatosa derivada de una parte distinta al miocardio de un adulto.  
donde la estructura tridimensional se puede obtener mediante un método que comprende las etapas de:

a) cultivar la célula madre mesenquimatosa derivada de la parte distinta al miocardio de un adulto sobre un soporte de cultivo celular injertado con una macromolécula respondedora a la temperatura que tiene una temperatura de solución crítica límite superior o una temperatura de solución crítica límite inferior con el agua de 0 °C a 80 °C.

b) fijar una temperatura media del cultivo a la temperatura de la solución del límite superior o más o a la temperatura de la solución del límite inferior o menos; y

c) desprender la célula cultivada como una estructura tridimensional.

2. La estructura de acuerdo con el punto 1, donde la célula deriva de un sujeto, aplicándose la estructura al sujeto.

3. La estructura de acuerdo con el punto 1, donde la célula no deriva de un sujeto, aplicándose la estructura al sujeto.

4. La estructura de acuerdo con el punto 1, donde la célula derivada de una parte distinta al miocardio es una célula no derivada del corazón.

5. La estructura de acuerdo con el punto 1, en la aplicabilidad al corazón incluye la aplicabilidad al miocardio.

6. La estructura de acuerdo con el punto 1, que comprende una lámina de células en monocapa.

7. La estructura de acuerdo con el punto 1, que comprende una lámina de células en multicapa.

8. La estructura de acuerdo con el punto 7, donde la lámina de células en multicapas tiene conexión biológica.

5 9. La estructura de acuerdo con el punto 8, donde la conexión biológica se selecciona del grupo que consiste en la conexión mediante la matriz extracelular, la conexión eléctrica y la conexión sin almacén.

10. El medicamento, que comprende una estructura tridimensional de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9.

10 11. El medicamento de acuerdo con el punto 10 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en insuficiencia cardíaca, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, miocardiopatía, miocarditis, miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía hipertrófica en fase dilatada y miocardiopatía dilatada.

15 12. Un método para producir una estructura tridimensional aplicable al corazón, que comprende una célula madre mesenquimatosa derivada de una parte distinta al miocardio de un adulto, comprendiendo el método las etapas de:

20 a) cultivar la célula madre mesenquimatosa derivada de la parte distinta al miocardio de un adulto sobre un soporte de cultivo celular injertado con una macromolécula respondedora a la temperatura que tiene una temperatura de solución crítica límite superior o una temperatura de solución crítica límite inferior con el agua de 0 °C a 80 °C.

25 b) fijar una temperatura media del cultivo a la temperatura de la solución del límite superior o más o a la temperatura de la solución del límite inferior o menos; y

c) desprender la célula cultivada como una estructura tridimensional.

30 13. El método de acuerdo con el punto 12, donde se añade ácido ascórbico o un derivado del mismo antes de la etapa de desprendimiento.

14. El método de acuerdo con el punto 12 o 13, donde un tratamiento usando una enzima de degradación de proteínas no se realiza durante o antes de la etapa de desprendimiento.

35 15. El método de acuerdo con el punto 12 o 13, donde la macromolécula respondedora a la temperatura es poli(N-isopropilacrilamida).

40 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá a modo de realizaciones preferidas. Los expertos en la técnica entenderán que las realizaciones de la presente invención se pueden realizar o efectuar adecuadamente en base a la descripción de la presente memoria descriptiva y técnicas de uso habitual bien conocidas en la materia. Los expertos en la técnica pueden reconocer fácilmente La función y el efecto de la presente invención.

45 La presente invención proporciona un tejido protésico implantable. El tejido tiene un tamaño grande que no se puede conseguir mediante técnicas convencionales y tiene una resistencia excelente. De este modo, se hace posible tratar sitios que no pueden ser accesibles convencionalmente al tratamiento de implantación usando materiales protésicos convencionales. La presente invención hace posible proporcionar un tejido protésico o estructura tridimensional hecho de células madre mesenquimatosas derivadas de partes distintas al miocardio. Por tanto, se pueden usar partes distintas al miocardio antológico como material para realizar terapias de implantación.

#### 50 **Breve descripción de las figuras**

La Figura **1A** muestra un ejemplo donde se produce un tejido protésico de la presente invención usando un polímero respondedor a la temperatura.

55 La Figura **1B** muestra otro ejemplo donde se produce un tejido protésico de la presente invención usando un polímero respondedor a la temperatura.

La Figura **2** muestra un ejemplo donde se compara una terapia usando un tejido protésico de la presente invención con una terapia celular.

60 La Figura **3** muestra un esquema de terapia de ejemplo usando un tejido protésico de la presente invención.

La Figura **4** muestra un límite de terapias regeneradoras de miocardio usando implantación celular. Como se muestra en la parte derecha, un sitio dañado no cicatriza completamente con células en implantación celular.

65

La Figura 5 muestra un límite de implantación tisular usando un armazón.

La Figura 6 muestra un ejemplo de implantación de un tejido protésico de la presente invención en un corazón infartado.

5 La Figura 7 muestra un estado de un tejido protésico de la presente invención después de la implantación. La parte izquierda muestra el tejido 2 semanas después de la implantación, mientras que la parte derecha muestra el tejido 8 semanas después de la implantación. La tinción con HE se muestra sobre el panel izquierdo (izquierda:  $\times 100$ ; derecha:  $\times 200$ ). La tinción del factor VIII se muestra debajo del panel izquierdo, mientras que la tinción de conexina 43 se muestra a la derecha. El panel derecho muestra la tinción con HE (superior:  $\times 40$ ; inferior:  $\times 100$ ).

10 La Figura 8 es un ecograma de ultrasonidos que muestra un ejemplo de evaluación de la función cardíaca mejorada por un tejido protésico de la presente invención. La parte izquierda muestra un control, mientras que la parte derecha muestra una lámina de cardiomiocitos.

15 La Figura 9 muestra un ejemplo de evaluación de la función cardíaca mejorada por un tejido protésico de la presente invención. En la figura se muestran la fracción de eyección (FE), el acortamiento fraccional (AF) y el área endosistólica (AES). Los cuadrados indican la lámina de cardiomiocitos, mientras que los triángulos indican el control. Una fotografía del panel izquierdo es una fotografía de ecografía de ultrasonidos (superior: control; inferior: lámina de cardiomiocitos).

20 La Figura 10 muestra una técnica para la evaluación electrofisiológica de un tejido protésico de la presente invención. La parte derecha muestra esquemáticamente cambios en el potencial eléctrico, mientras que la parte izquierda muestra valores numéricos del umbral. La parte derecha muestra un control y una lámina de fibroblastos de la presente invención y una lámina de cardiomiocitos de la presente invención.

25 La Figura 11 muestra una evaluación electrofisiológica de un tejido protésico de la presente invención. La parte superior izquierda muestra un corazón normal, la parte inferior izquierda muestra un modelo de infarto y la parte inferior derecha muestra una terapia usando una lámina de cardiomiocitos.

La Figura 12 muestra un ejemplo de procedimientos para aislar y cultivar mioblastos en un método de acuerdo con la presente invención.

30 La Figura 13 muestra un ejemplo de cultivo de tejido protésico que contiene mioblastos en un método de acuerdo con la presente invención.

La Figure 14 muestra un esquema experimental de ejemplo usando un tejido protésico de mioblastos de la presente invención.

35 La Figure 15 muestra fotografías que indican un tejido protésico de mioblastos de la presente invención 4 semanas después de la implantación ( $\times 10$ ,  $\times 200$  y  $\times 1000$ ).

40 La Figure 16 muestra una operación de implantación de ejemplo usando un tejido protésico de mioblastos de la presente invención.

45 La Figure 17 muestra una implantación de ejemplo de un tejido protésico de mioblastos de la presente invención (tinción histológica). La parte superior muestra el tejido protésico, inyección celular y el control desde la derecha ( $\times 10$ ). La parte inferior muestra una fotografía ( $\times 400$ ) para cada uno.

50 La Figure 18 muestra un ecograma de ultrasonidos de la implantación de un tejido protésico de mioblastos de la presente invención (parte superior) y un resultado de ejemplo del análisis en modo M (parte inferior). La parte izquierda muestra un, mientras que la parte derecha muestra el corazón infartado tras el tratamiento.

55 La Figura 19 muestra resultados de ejemplo de una prueba para la función cardíaca de un tejido protésico de mioblastos de la presente invención tras la implantación. Se muestran la fracción de eyección (FE), el acortamiento fraccional (AF), el área endosistólica (AES) y la onda E. Los rombos indican un tejido protésico de mioblastos, los cuadrados indican la inyección de mioblastos y los triángulos indican un control.

60 La Figure 20 muestra un ejemplo de la comparación en la presión de la pared entre un tejido protésico de mioblastos de la presente invención y mioblastos. Los resultados de las fotografías (parte superior izquierda: tejido protésico; parte superior derecha: inyección de células; parte inferior derecha: control) se resumen en un gráfico de la parte inferior izquierda.

65 La Figura 21 muestra la comparación entre un tejido protésico de mioblastos de la presente invención y un control visualizado mediante tinción con desmina, tinción del factor VIII y expresión de GFP. La parte superior

muestra la tinción con desmina (izquierda: tejido protésico), expresión de GFP (derecha: tejido protésico) y expresión de GFP (centro: control). La parte inferior muestra la tinción del factor VIII (tejido protésico, inyección celular y el control desde la derecha).

5 Las Figuras **22A** a **22F** muestran la conexión electrofisiológica cuando se usa un tejido protésico de la presente invención. Las Figuras **22A** a **22C** muestran un control, mientras que las Figuras **22D** a **22F** muestran un tejido protésico de mioblastos. En el tejido protésico de mioblastos se observa la conexión electrofisiológica.

10 Las Figuras **23A** a **23C** muestran la expresión de GFP cuando se usa un tejido protésico de la presente invención. La expresión de GFP se muestra mediante visualización de imágenes en movimiento. Las Figuras **23A** a **23C** proporcionan marcos representativos como imágenes fijas.

15 Las Figuras **24A** a **24C** muestran un análisis temporal mediante ecografías de ultrasonidos de ejemplo del tratamiento usando un tejido protésico de la presente invención. Los resultados de la ecográfica de ultrasonidos para un corazón infartado tratado de acuerdo con la presente invención se muestran mediante visualización de imágenes en movimiento. Las Figuras **24A** a **24C** proporcionan marcos representativos como imágenes fijas.

20 Las Figuras **25A** a **25C** muestran un análisis temporal mediante ecografías de ultrasonidos de ejemplo del tratamiento usando un tejido protésico de la presente invención. La Figura **25A** muestra un control, mientras que la Figura **25B** muestra el uso de un tejido protésico de la presente invención. Los resultados de la ecográfica de ultrasonidos se muestran mediante visualización de imágenes en movimiento. Las Figuras **25A** a **25C** proporcionan marcos representativos como imágenes fijas. La parte izquierda muestra un control del corazón infartado, mientras que la parte derecha muestra un resultado de una lámina de mioblastos de la presente invención.

25 La Figura **26A** muestra un análisis mediante ecografías de ultrasonidos de ejemplo del tratamiento usando un tejido protésico de la presente invención. La Figura **26A** es una fotografía que muestra la misma muestra que en las Figuras **25A** a **25C** a un punto de tiempo diferente. Los resultados de la ecográfica de ultrasonidos se muestran mediante visualización de imágenes en movimiento. La Figura **26A** proporciona marcos representativos como imágenes fijas. La parte izquierda muestra un control del corazón infartado, mientras que la parte derecha muestra un resultado de una lámina de mioblastos de la presente invención.

30 La Figura **26B** muestra un análisis mediante ecografías de ultrasonidos de ejemplo del tratamiento usando un tejido protésico de la presente invención. La Figura **26B** es una fotografía que muestra la misma muestra que en las Figuras **25A** a **25C** a un punto de tiempo diferente. Los resultados de la ecográfica de ultrasonidos se muestran mediante visualización de imágenes en movimiento. La Figura **26B** proporciona marcos representativos como imágenes fijas. La parte izquierda muestra un control del corazón infartado, mientras que la parte derecha muestra un resultado de una lámina de mioblastos de la presente invención.

35 La Figura **26C** muestra un análisis mediante ecografías de ultrasonidos de ejemplo del tratamiento usando un tejido protésico de la presente invención. La Figura **26C** es una fotografía que muestra la misma muestra que en las Figuras **25A** a **25C** a un punto de tiempo diferente. Los resultados de la ecográfica de ultrasonidos se muestran mediante visualización de imágenes en movimiento. La Figura **26C** proporciona marcos representativos como imágenes fijas. La parte izquierda muestra un control del corazón infartado, mientras que la parte derecha muestra un resultado de una lámina de mioblastos de la presente invención.

40 Las Figuras **27A** a **27C** muestran un análisis mediante ecografías de ultrasonidos de ejemplo del tratamiento usando un tejido protésico de la presente invención. Los resultados de la ecográfica de ultrasonidos para un corazón infartado tratado de acuerdo con la presente invención se muestran mediante visualización de imágenes en movimiento. Las Figuras **27A** a **27C** proporcionan marcos representativos como imágenes fijas.

45 La Figura **28** muestra la afinidad celular mediante RT-PCR.

50 La Figura **29** muestra un cambio en una lámina de mioblastos implantada tras la implantación.

55 La Figura **30A** muestra un ejemplo de la tinción tricrómica de Masson de un tejido protésico de la presente invención usando mioblastos, que se aplicó a un hámster con cardiomiopatía. La parte superior muestra la implantación de una lámina (tejido protésico), implantación celular y un control ( $\times 10$ ). La parte inferior muestra una vista agrandada para cada uno ( $\times 40$ ).

60 La Figura **30B** muestra la histología (la lámina de mioblastos es aceptada por un corazón cardiomiopático dilatado y agranda una pared ventricular).

65 La Figura **30C** muestra la comparación de los niveles de expresión de  $\alpha$ -sarcoglicano (la implantación de la lámina de mioblastos potencia la expresión de  $\alpha$ -sarcoglicano).

La Figura **30D** muestra la comparación de los niveles de expresión de  $\beta$ -sarcoglicano (la implantación de la lámina de mioblastos potencia la expresión de  $\beta$ -sarcoglicano).

5 La Figure **31** muestra una tasa de supervivencia de hámsteres cardiomiopático en los que se ha implantado un tejido protésico (lámina) que comprende mioblastos de la presente invención. La inyección de células como tales se compara con la administración de un tejido protésico.

10 La Figura **32** muestra las características eléctricas tras la implantación de un tejido protésico de la presente invención. La parte izquierda muestra un tejido protésico que comprende cardiomiocitos, mientras que la parte derecha muestra un tejido protésico que comprende mioblastos.

15 La Figura **33A** muestra una terapia para hámster con miocardiopatía dilatada usando un tejido protésico de la presente invención. La parte izquierda muestra la FE, mientras que la parte derecha muestra la tinción con HE. La parte inferior derecha muestra la tinción tricrómica de Masson.

La Figura **33B** muestra un resultado de la ecocardiografía 48 semanas después de la implantación (la implantación de láminas de mioblastos mejora la función cardíaca de un corazón con miocardiopatía dilatada).

20 La Figura **33C** muestra un resultado de la ecocardiografía (la contractilidad de un ventrículo izquierdo) 48 semanas después de la implantación (la implantación de láminas de mioblastos mejora la contractilidad del ventrículo izquierdo con miocardiopatía dilatada).

25 La Figure **34** muestra un ejemplo de una terapia para un modelo de infarto en cerdos usando un tejido protésico de la presente invención.

La Figure **35** muestra un efecto terapéutico (contractilidad) en un modelo de infarto en cerdos usando un tejido protésico de la presente invención.

30 La Figure **36** muestra un efecto terapéutico (expansibilidad) en un modelo de infarto en cerdos usando un tejido protésico de la presente invención.

La Figura **37** muestra una lámina producida mediante un método de producción de tejido protésico sin ácido ascórbico.

35 La Figura **38** muestra una lámina producida mediante un método de producción de tejido protésico con ácido ascórbico de acuerdo con la presente invención.

40 La Figura **39** muestra una lámina producida mediante un método de producción de tejido protésico con ácido ascórbico de acuerdo con la presente invención (tinción con HE).

La Figura **40** muestra una técnica para medir las características de tensión y distorsión para determinar la resistencia a la tracción.

45 La Figura **41** muestra un método para obtener una carga/eliminación de una curva de carga.

La Figura **42** muestra un estado de un tejido obtenido cultivando células sinoviales en presencia de ácido ascórbico 2-fosfato.

(Descripción del listado de secuencias)

50 La SEC ID N° 1 expone una secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada de miosina IIa (humana: N° de acceso NM\_017534).

55 La SEC ID N° 2 expone una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de miosina IIa (humana: N° de acceso NM\_017534).

La SEC ID N° 3 expone una secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada de miosina IIb (humana: N° de acceso NM\_017533).

60 La SEC ID N° 4 expone una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de miosina IIb (humana: N° de acceso NM\_017533).

La SEC ID N° 5 expone una secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada de miosina IIc (IIx) (humana: N° de acceso NM\_005963).

65

La SEC ID N° 6 expone una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de miosina IId (IIx) (humana: N° de acceso NM\_005963).

5 La SEC ID N° 7 expone una secuencia de ácido nucleico de la CD56 (humana: N° de acceso U63041).

La SEC ID N° 8 expone una secuencia de aminoácidos de la CD56 (humana: N° de acceso U63041).

10 La SEC ID N° 9 expone una secuencia de ácido nucleico de MyoD humana (n° de acceso en GENBANK X56677).

La SEC ID N° 10 expone una secuencia de polipéptidos codificada por la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEC ID N° 2.

15 La SEC ID N° 11 expone una secuencia de ácido nucleico del factor 5 miogénico humano (n° de acceso en GENBANK NM\_005593).

. La SEC ID N° 12 expone una secuencia de polipéptidos codificada por la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEC ID N° 3.

20 La SEC ID N° 13 expone una secuencia de ácido nucleico de la miogenina humana (factor biogénico 4) (n° de acceso en GENBANK BT007233).

La SEC ID N° 14 expone una secuencia de polipéptidos codificada por la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEC ID N° 5.

25 La SEC ID N° 15 expone un cebador directo en la RT-PCR para SRY.

La SEC ID N° 16 expone un cebador inverso en la RT-PCR para SRY.

30 La SEC ID N° 17 expone una sonda en la RT-PCR para SRY.

La SEC ID N° 18 expone un cebador directo en la RT-PCR para IL2.

35 La SEC ID N° 19 expone un cebador inverso en la RT-PCR para IL3.

La SEC ID N° 20 expone una sonda en la RT-PCR para IL2.

### **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

40 La presente invención se describirá a continuación. Debe entenderse a lo largo de la presente memoria descriptiva que los artículos para las formas en singular incluyen el concepto de su pluralidad a menos que se mencione lo contrario. Por tanto, los artículos o adjetivos par alas formas en singular (por ejemplo, “un/uno”, “una”, “el/la” y similares) incluyen el concepto de su pluralidad a menos que se especifique lo contrario. Asimismo, debe entenderse que los términos como se usan en el presente documento tienen las definiciones usadas habitualmente en la técnica a menos que se mencione lo contrario. Por tanto, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que entienden habitualmente los expertos en la técnica relevante. Por el contrario, la presente solicitud (incluyendo las definiciones) tiene prioridad.

(Definición de los términos)

50 Las definiciones de los términos específicos usados en el presente documento se describen más adelante.

(Medicina regeneradora)

55 Como se usa en el presente documento, el término “regeneración” hace referencia a un fenómeno donde cuando un organismo individual pierde una parte de tejido, el tejido restante crece y se recupera. La extensión o modo de regeneración varía en función de la especie animal o entre los tejidos en el mismo individuo. La mayoría de los tejidos humanos tienen una capacidad de regeneración limitada y, por tanto, no se espera que se produzca la regeneración completa si se pierde una gran parte de tejido. En el caso de daños graves, puede crecer un tejido que tiene una fuerte capacidad de proliferación diferente de la del tejido perdido, lo que tiene como resultad una regeneración incompleta cuando el tejido dañado se regenera de forma incompleta y la función del tejido no se puede recuperar. En este caso, se usa una estructura hecha de un material bioabsorbible para prevenir que un tejido que tenga una fuerte capacidad de proliferación infiltre la parte defectuosa del tejido para asegurar un espacio para la proliferación del tejido dañado. Además, suplementando con un factor de crecimiento celular, se potencia la capacidad de regeneración del tejido dañado. Dicha técnica de regeneración se aplica a cartílagos, huesos y nervios periféricos, por ejemplo. Hasta ahora se ha creído que las células nerviosas y los músculos cardíacos tienen nula o

mala capacidad de regeneración. Recientemente se ha notificado que existen células madre de tejido (células madre somáticas), que tienen ambas la capacidad de diferenciarse en estos tejidos y capacidad de autorreplicación. Las expectativas son muy altas para la medicina regenerativa usando células madre de tejido. Las células madre embrionarias (células ME) son células que tienen la capacidad de diferenciarse en todos los tejidos. Se han efectuado esfuerzos para usar células ME para la regeneración de órganos complicados, tales como de riñón, de hígado y similares, pero todavía no se han realizado.

El término “célula” se usa en el presente documento en su sentido más amplio en la técnica, haciendo referencia a una unidad estructural de tejido de un organismo multicelular, que es capaz de autorreplicarse, tiene información genética y un mecanismo para expresarla y está rodeada por una estructura de membrana que aísla el cuerpo vivo del exterior. En el método de la presente invención se puede usar cualquier célula como sujeto. El número de células usadas en la presente invención se puede contar mediante un microscopio óptico. Al contra usando un microscopio óptico se cuenta el número de núcleos. Los tejidos se laminan en secciones de tejido que después se tiñen con hematoxilina-eosina (HE) para variegar los núcleos derivados de matrices extracelulares (por ejemplo, elastina o colágeno) y células. Estas secciones de tejido se observan bajo un microscopio óptico y se puede estimar que el número de núcleos en un área concreta (por ejemplo, 200  $\mu\text{m}$   $\times$  200  $\mu\text{m}$ ) es el número de células. Las células usadas en el presente documento pueden ser células de origen natural o células modificadas artificialmente (por ejemplo, células de fusión, células modificadas genéticamente etc.). Ejemplos de fuentes de células incluyen, entre otros, un cultivo de una sola célula, o tejido corporal de un animal transgénico que ha crecido normalmente; una mezcla de células derivadas de líneas celulares cultivadas normalmente, y similares.

Como se usa en el presente documento, la expresión “célula madre” hace referencia a una célula capaz de autorreplicarse y pluripotencia. El término “célula madre” excluirá las células madre embrionarias humanas. Las células madre tisulares tienen un nivel relativamente limitado de diferenciación, al contrario que las células madre embrionarias. Las células madre tisulares están presentes en los tejidos y tienen una estructura intracelular indiferenciada. Las células madre tisulares tienen una proporción núcleo/citoplasma más alta y tienen menos orgánulos intracelulares. La mayoría de las células madre tisulares tienen pluripotencia, un ciclo celular largo y capacidad de proliferación más allá de la vida del individuo. Como se usa en el presente documento, las células madre tisulares también se pueden usar dependiendo de la circunstancia.

Las células madre tisulares se clasifican en categorías de sitios de los que derivan las células, tales como el sistema dérmico, el sistema digestivo, el sistema de la médula ósea, el sistema nervioso y similares. Las células madre tisulares en el sistema dérmico incluyen células madre epidérmicas, células madre del folículo piloso y similares. Las células madre tisulares en el sistema digestivo incluyen células madre pancreáticas (habituales), células madre hepáticas y similares. Las células madre tisulares en el sistema de la médula ósea incluyen células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimatosas y similares. Las células madre tisulares en el sistema nervioso incluyen células madre neurales, células madre retinianas y similares.

Como se usa en el presente documento, la expresión “célula somática” hace referencia a cualquier célula que no sea una célula germinal, tal como un huevo, un espermatozoide o similares, que no transfiere su ADN a la siguiente generación. Normalmente, las células somáticas tienen nula o limitada pluripotencia. Las células somáticas usadas en el presente documento pueden ser de origen natural o estar modificadas genéticamente siempre que puedan alcanzar el tratamiento indicado.

El origen de una célula madre se clasifica en el ectodermo, endodermo o mesodermo. Las células madre de origen ectodérmico están principalmente presentes en el cerebro, incluidas las células madre neurales. Las células madre de origen endodérmico están principalmente presentes en la médula ósea, incluidas las células madre de los vasos sanguíneos, las células madre hematopoyéticas, las células madre mesenquimatosas y similares. Las células madre de origen mesodérmico están principalmente presentes en los órganos, incluyendo las células madre hepáticas, las células madre pancreáticas, y similares. Como se usa en el presente documento, las células somáticas pueden derivar de cualquier mesénquima. Preferentemente, se pueden usar las células somáticas derivadas del mesénquima.

Las células para usar en la construcción de un tejido protésico o estructura tridimensional de la presente invención incluyen células madre mesenquimatosas.

Como se usa en el presente documento, la expresión “célula madre mesenquimatosas” hace referencia a una célula madre hallada en el mesénquima. La expresión “célula madre mesenquimatosas” puede abreviarse en el presente documento a “CMM”. Mesénquima hace referencia a una población de células libres que están en forma asteroide o tienen proyecciones irregulares y unen huecos entre los tejidos epiteliales y que son reconocidas en cada etapa de desarrollo de animales multicelulares. El mesenquimal también se refiere al tejido formado con cemento intracelular asociado con las células. Las células madre mesenquimatosas tienen capacidad de proliferación y la capacidad para diferenciarse en células óseas, células de cartílago, células musculares, células estromales, células de tendones y células grasas. Las células madre mesenquimatosas se usan con el fin de cultivar o hacer crecer células de la médula ósea o similares extraídas de pacientes o diferenciarlas en células de cartílago u osteoblastos. Las células madre mesenquimatosas también se usan como material de reconstrucción, tales como huesos alveolares, huesos,

cartílagos o articulaciones para artropatía o similares; y similares. Existe una gran demanda de células madre mesenquimatosas. Asimismo, las células madre mesenquimatosas se pueden diferenciar en células sanguíneas y células linfoides. Por tanto, existe una demanda creciente de células madre mesenquimatosas. Un tejido protésico o estructura tridimensional de la presente invención que comprende células madre mesenquimatosas o células madre mesenquimatosas diferenciadas es particularmente útil cuando se requiere una estructura en estas aplicaciones.

Como se usa en el presente documento, el término "aislado" significa que el material acompañante natural al menos se reduce, o preferentemente se elimina sustancialmente completamente, en circunstancias normales. Por tanto, la expresión "célula aislada" hace referencia a una célula sustancialmente libre de otras sustancias acompañantes (por ejemplo, otras células, proteínas, ácidos nucleicos etc.) en circunstancias naturales. La expresión "tejido aislado" hace referencia a un tejido sustancialmente libre de sustancias distintas al tejido (por ejemplo, en el caso de tejidos protésicos, sustancias, armazones, láminas, recubrimientos etc. usados cuando se produce el tejido protésico. El término "aislado" en relación con ácidos nucleicos o polipéptidos significa que, por ejemplo, los ácidos nucleicos o los polipéptidos están sustancialmente libres de sustancias celulares o medios de cultivo cuando se producen mediante técnicas de ADN recombinante; o sustancias químicas precursoras u otras sustancias químicas cuando se sintetizan químicamente. Los ácidos nucleicos aislados carecen preferentemente de secuencias que flanquean de forma natural el ácido nucleico dentro de un organismo del que deriva el ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en el extremo 5' y el extremo 3' del ácido nucleico).

Como se usa en el presente documento, el término "intacto" en relación con tejidos protésicos, estructuras tridimensionales y similares, hace referencia a ausencia de lesión externa física. Por ejemplo, cuando se produce un tejido protésico o similares y después se separa de una circunstancia donde se ha realizado la producción, tiene sustancialmente ninguna lesión externa, tal como impacto físico o similares.

Como se usa en el presente documento, el término "establecido" en relación con las células hace referencia a un estado de una célula donde una propiedad concreta (pluripotencia) de la célula se mantiene y la célula sufre proliferación estable en condiciones de cultivo. Por tanto, las células madre establecidas mantienen la pluripotencia.

Como se usa en el presente documento, la expresión "no embrionario" hace referencia a no derivar directamente de embriones tempranos. Por tanto, la expresión "no embrionaria" hace referencia a células derivadas de partes del cuerpo distintas a los embriones tempranos. Asimismo, las células madre embrionarias (por ejemplo, células madre embrionarias modificadas genéticamente o de fusión etc.) están abarcadas por las células no embrionarias.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula diferenciada" hace referencia a una célula que tiene una función y una forma especializadas (por ejemplo, células musculares, neuronas etc.) Al contrario que las células madre, las células diferenciadas tienen poca o nula pluripotencia. Los ejemplos de células diferenciadas incluyen células epidérmicas, células del parénquima pancreático, células del conducto pancreático, células hepáticas, células sanguíneas, células de músculo cardíaco, células de músculo esquelético, osteoblastos, mioblastos esqueléticos, neuronas, células endoteliales vasculares, células pigmentarias, células de músculo liso, células de grasa, células óseas, células de cartílago y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "tejido" se refiere a un grupo de células que tienen la misma función y forma en los organismos celulares. En organismos multicelulares, las células constituyentes normalmente están diferenciadas, de modo que las células tienen funciones especializadas, lo que da lugar a la división del trabajo. Por tanto, los organismos multicelulares no son simples agregaciones celulares sino que constituyen grupos de células orgánicas o sociales que tienen una determinada función y estructura. Como ejemplos de tejidos se incluyen, entre otros, tejido del integumento, tejido conjuntivo, tejido muscular, tejido nervioso y similar.

Como se usa en el presente documento, la expresión "tejido protésico" se refiere a tejido que tiene un estado diferente de los estados naturales. Normalmente, en el presente documento un tejido protésico se prepara mediante cultivo celular. El tejido que se elimina de un organismo y no se somete a ningún tratamiento no se denomina tejido protésico. Un tejido protésico puede incluir materiales derivados de organismos y materiales no derivados de organismos. El tejido protésico de la presente invención normalmente comprende una célula y/o material biológico y puede comprender otros materiales. Más preferentemente, un tejido protésico de la presente invención está compuesto sustancialmente por, únicamente, una célula y/o un material biológico. Dicho material biológico deriva preferentemente de células que constituyen el tejido (por ejemplo, matriz extracelular etc.).

Como se usa en el presente documento, la expresión "tejido protésico implantable" hace referencia a un tejido protésico que se puede usar para la implantación clínica real y puede funcionar como un tejido en el lugar de la implantación durante un determinado periodo de tipo tras la implantación. Normalmente, el tejido protésico implantable tiene resistencia suficiente, tamaño suficiente, no porosidad suficiente, espesor suficiente, biocompatibilidad suficiente, afinidad suficiente y similar.

La resistencia suficiente de un tejido protésico implantable varía en función de una parte dirigida por la implantación, pero los expertos en la técnica pueden determinarla según sea adecuado. No obstante, un tejido protésico implantable tiene, preferentemente, al menos un nivel determinado de resistencia. Dicho nivel de resistencia (por

ejemplo, resistencia a la tracción) es al menos aproximadamente un 50 % de la resistencia natural de una parte dirigida por la implantación, preferentemente al menos aproximadamente un 60 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 70 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente un 80 % y lo más preferentemente al menos aproximadamente un 100 %. La resistencia se puede medir midiendo las características de resistencia o de distorsión o realizando una prueba de indentación de las características de deslizamiento como se describe más adelante.

El tamaño suficiente de un tejido protésico implantable varía en función de una parte dirigida por la implantación, pero los expertos en la técnica pueden determinarla según sea adecuado. No obstante, un tejido protésico implantable tiene, preferentemente, al menos un nivel determinado tamaño. Dicho tamaño (por ejemplo, área) es al menos 1 cm<sup>2</sup>, preferentemente al menos 2 cm<sup>2</sup>, más preferentemente al menos 3 cm<sup>2</sup>, incluso más preferentemente al menos 4 cm<sup>2</sup>, al menos 5 cm<sup>2</sup>, al menos 6 cm<sup>2</sup>, al menos 7 cm<sup>2</sup>, al menos 8 cm<sup>2</sup>, al menos 9 cm<sup>2</sup>, al menos 10 cm<sup>2</sup>, al menos 15 cm<sup>2</sup>, o al menos 20 cm<sup>2</sup>.

La no porosidad suficiente de un tejido protésico implantable varía en función de una parte dirigida por la implantación, pero los expertos en la técnica pueden determinarla según sea adecuado. Como se usa en el presente documento, el término "no porosidad" hace referencia a un estado que carece de poro(s). En el presente documento, el poro se refiere a un agujero que tiene un tamaño sustancial de un modo tal que el fluido corporal o su equivalente (por ejemplo, una solución acuosa etc.) se fuga de un tejido protésico. Por tanto, la no porosidad se puede determinar del siguiente modo. Un tejido protésico se coloca horizontalmente. El fluido corporal o su equivalente se coloca sobre el tejido. Se observa si el fluido corporal o su equivalente se sale o no del tejido. Si no hay fuga, se considera que el tejido tiene no porosidad.

El espesor suficiente de un tejido protésico implantable varía en función de una parte dirigida por la implantación, pero los expertos en la técnica pueden determinarla según sea adecuado. No obstante, un tejido protésico implantable tiene, preferentemente, al menos un nivel determinado espesor. Dicho espesor normalmente es de aproximadamente al menos 50 µm, preferentemente al menos aproximadamente 100 µm, más preferentemente aproximadamente 150 µm, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 200 µm, al menos aproximadamente 300 µm, al menos aproximadamente 400 µm, al menos aproximadamente 500 µm, al menos aproximadamente 600 µm, al menos aproximadamente 700 µm, al menos aproximadamente 800 µm, al menos aproximadamente 900 µm, al menos aproximadamente 1 mm. Cuando un tejido protésico implantable se implanta en el corazón, el tejido puede tener solo estos espesores mínimos. Cuando se usa tejido protésico implantable en otras aplicaciones, el tejido puede tener, preferentemente, un espesor mayor. En este caso, por ejemplo, el tejido protésico implantable tiene, preferentemente, un espesor de al menos 2 mm, más preferentemente de al menos 3 mm e incluso más preferentemente de 5 mm.

La biocompatibilidad suficiente de un tejido protésico implantable varía en función de una parte dirigida por la implantación, pero los expertos en la técnica pueden determinarla según sea adecuado. No obstante, un tejido protésico implantable tiene, preferentemente, al menos un nivel determinado de biocompatibilidad. Normalmente, un nivel deseado de biocompatibilidad es, por ejemplo, tal que se alcanza la conexión biológica con los tejidos circundantes sin ninguna inflamación, ninguna reacción inmunitaria o similar. La presente invención no está limitada a esto. En algunos casos (por ejemplo, córneas etc.), es menos probable que se produzca una reacción inmunológica. Por tanto, un tejido protésico implantable tiene biocompatibilidad en cierta medida, que alcanza el objeto de la presente invención incluso cuando es probable que se produzca una reacción inmunológica en otros órganos. Ejemplos de parámetros que indican biocompatibilidad incluyen, entre otros, la presencia o ausencia de una matriz extracelular, la presencia o ausencia de una reacción inmunológica, el grado de inflamación y similares. Dicha biocompatibilidad se puede determinar investigando la compatibilidad de un tejido protésico en un lugar de implantación tras la implantación (por ejemplo, confirmando que no se destruye un tejido protésico implantado). Véase "Hito Ishoku Zoki Kyozeitsu Hanno no Byori Soshiki Shindan Kijyun Kanbetsu Shindan to Seiken Hyohon no Toriatsukai (Zufu) Jinzo Ishoku, Kanzo Ishoku Oyobi Shinzo Ishoku [Pathological Tissue Diagnosis Criterion for Human Transplanted Organ Rejection Reaction Handling of Differential Diagnosis and Biopsy Specimen (Illustrated Book) Kidney Transplantation, Liver Transplantation and Heart Transplantation]" The Japan Society for Transplantation and The Japanese Society for Pathology editores, Kanehara Shuppan Kabushiki Kaisha (1998). De acuerdo con este documento, la biocompatibilidad se divide en de grado 0, 1A, 1B, 2, 3A, 3B y 4. En el grado 0 (sin rechazo agudo), en las muestras de biopsia no se encuentran reacciones de rechazo agudo, fallo de los cardiomiocitos o similares. En el Grado 1A (rechazo agudo leve focal), existe infiltración focal de linfocitos grandes alrededor de los vasos sanguíneos o en el tejido intersticial, mientras que no hay daños en los cardiomiocitos. Esta observación se obtiene en una o una pluralidad de muestras de biopsia. En el Grado 1B (rechazo agudo leve difuso), existe infiltración difusa de linfocitos grandes alrededor de los vasos sanguíneos o en el tejido intersticial, o en ambos, mientras que no hay daños en los cardiomiocitos. En el Grado 2 (rechazo agudo moderado focal), se observa un único foco de infiltración de células inflamatorias que claramente bordean las porciones circundantes. Las células de inflamación son linfocitos grandes activados y pueden incluir eosinófilos. En las lesiones se observan daños en los cardiomiocitos asociados con la modificación de músculo cardíaco. En el Grado 3A (rechazo agudo moderado multifocal) existen múltiples focos de infiltración de células inflamatorias que son linfocitos grandes activados y pueden incluir eosinófilos. Do o más de los múltiples focos de infiltración inflamatoria de células inflamatorias tienen daños en los cardiomiocitos. En algunos casos, también hay una infiltración irregular de células

inflamatorias en el endocardio. Los focos de infiltración se observan en una o una pluralidad de muestras de biopsia. En el Grado 3B (rechazo agudo grave límite y multifocal), existen más focos de infiltración confluyente y difusa de células inflamatorias que se encuentran en más muestras de biopsia que los observados en el Grado 3A. Existe infiltración de células inflamatorias, incluyendo linfocitos grandes y eosinófilos, en algunos casos neutrófilos, así como daños en los cardiomiocitos. No existe hemorragia. En el grado 4 (rechazo agudo grave), existe infiltración de varias células inflamatorias, incluyendo linfocitos activados, eosinófilos y neutrófilos. Siempre se producen daños a los cardiomiocitos y necrosis de cardiomiocitos. Normalmente también se observa edema, hemorragia y/o angeítis. Normalmente se observa infiltración de células inflamatorias en el endocardio, diferente del efecto de "acolchamiento". Cuando se administra una fuerte terapia usando un inmunosupresor durante un periodo de tiempo considerablemente largo, el edema y la hemorragia pueden ser más significativos que la infiltración.

La afinidad suficiente de un tejido protésico implantable varía en función de una parte dirigida mediante implantación, pero los expertos en la técnica pueden determinarla según sea adecuado. Ejemplos de parámetros para la afinidad incluyen, entre otros, capacidad de realizar conexión biológica entre un tejido protésico implantado y su lugar de implantación, y similares. Dicha afinidad se puede determinar en base a la presencia de conexión biológica en un lugar de implantación tras la implantación. La afinidad preferible es tal en el presente documento que un tejido protésico implantado tenga la misma función que la de un lugar donde se implanta el tejido, por ejemplo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "tejido membranoso" hace referencia a un tejido en forma de membrana y también se denomina "tejido planar". Ejemplos de tejido membranoso incluyen una parte de tejido que tiene una determinada zona de un órgano (por ejemplo, pericardio, duramadre, córnea etc.) o tejido en forma de bolsa y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "órgano" hace referencia a una estructura que es una parte específica de un organismo individual donde una determinada función del organismo individual se realiza localmente y que es morfológicamente independiente. En general, en organismos multicelulares (por ejemplo, animales y plantas), los órganos están hechos de varios tejidos en una disposición espacial específica y el tejido está hecho de una serie de células. Ejemplos de dichos órganos incluyen, entre otros, piel, vaso sanguíneo, córnea, riñón, corazón, hígado, cordón umbilical, intestino, nervio, pulmón, placenta, páncreas, cerebro, articulación, hueso, cartílago, extremidades periféricas, retina y similares. Ejemplos de dichos órganos incluyen, entre otros, órganos del sistema de la piel, el sistema pancreático parenquimatoso, el sistema ductal pancreático, el sistema hepático, el sistema sanguíneo, el sistema del miocardio, el sistema muscular esquelético, el sistema de los osteoblastos, el sistema de mioblastos esqueléticos, el sistema nervioso, el sistema endotelial de los vasos sanguíneos, el sistema pigmentario, el sistema de músculo liso, el sistema graso, el sistema óseo, el sistema de cartílago y similares.

Como se usa en el presente documento, la expresión "órgano en forma de bolsa" hace referencia a un órgano que tiene una expansión tridimensional y cuyo interior puede estar conectado a través de un tejido tubular con el exterior. Ejemplos de órganos con forma de bolsa incluyen, entre otros, corazón, hígado, riñón, estómago, bazo y similares.

En una realización, la presente invención está dirigida a órganos relacionados con el sistema vascular y, preferentemente, a órganos isquémicos (por ejemplo, corazón que tiene infarto de miocardio, corazón que tiene isquemia etc.). En una realización preferida, la presente invención está dirigida a vasos sanguíneos, tejido de tipo vaso sanguíneo, válvulas cardíacas, pericardio, duramadre, córnea y huesos. En otra realización preferida, la presente invención está dirigida al corazón, las válvulas cardíacas, el pericardio y los vasos sanguíneos.

Como se usa en el presente documento, el término "envuelve" en relación con un tejido protésico, una estructura tridimensional o similares que envuelve una parte determinada (por ejemplo, un lugar dañado, etc.) significa que el tejido protésico o similar está dispuesto de un modo tal que cubre la parte (es decir, oculta una lesión o similar). Los términos "envuelve(n)" y "dispone(n) (o localiza(n)) de modo que cubre(n)" se usan de forma intercambiable. Observando la relación especial entre la parte y el tejido protésico o similar se puede determinar si la parte está o no cubierta por el tejido protésico o similar. En una realización preferida, en una etapa de envoltura, un tejido protésico o similar puede envolver con un giro un determinado sitio.

Un "tiempo suficiente requerido para que un tejido protésico se una biológicamente a una parte" en el presente documento varía en función de una combinación de la parte y el tejido protésico, pero los expertos en la técnica pueden determinarlo según sea adecuado en base a la combinación. Ejemplos de dicho tiempo incluyen, entre otros, 2 semanas, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 año y similares, tras la operación. En la presente invención, un tejido protésico comprende, preferentemente, sustancialmente solo células y materiales derivados de las células y, por tanto, no existe material concreto que necesite extraerse después de la operación. Por tanto, el límite inferior del tiempo suficiente no es particularmente importante. Por tanto, en este caso, es más preferible un tiempo más prolongado. Si el tiempo es sustancialmente extremadamente largo, el refuerzo se completa sustancialmente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "reacción inmunológica" hace referencia a una reacción debido a la disfunción de la tolerancia inmunológica entre un injerto y un huésped. Ejemplos de reacciones inmunológicas incluyen, entre otros, una reacción de rechazo hiperagudo (en varios minutos desde la implantación) (reacción

inmunológica causada por anticuerpos, tal como  $\beta$ -Gal o similar), una reacción de rechazo agudo (reacción causada por la inmunidad celular aproximadamente de 7 a 21 días después de la implantación), una reacción de rechazo crónico (reacción de rechazo causada por la inmunidad celular 3 o más meses después de la operación) y similares.

5 Como se usa en el presente documento, la provocación de una reacción inmunológica se puede confirmar mediante análisis patológico e histológico del tipo, el número o similar de la infiltración de células (inmunológicas) en tejido implantado usando tinción (por ejemplo, tinción con HE etc.), tinción inmunológica o inspección microscópica de secciones tisulares.

10 Como se usa en el presente documento, el término "calcificación" hace referencia a la precipitación de sustancias calcáreas en organismos.

15 Como se usa en el presente documento, la "calcificación" *in vivo* se puede determinar midiendo la concentración de calcio. Específicamente, se extrae el tejido implantado; la sección tisular se disuelve mediante tratamiento ácido o similar y la absorción atómica de la solución se mide mediante un dispositivo de cuantificación de oligoelementos.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "dentro del o los organismos" o "*in vivo*" hace referencia a la parte interna del o los organismos. En un contexto específico, "dentro del o los organismos" hace referencia a una posición en la cual se coloca un tejido u órgano sujeto.

Como se usa en el presente documento, "*in vitro*" indica que una parte de un organismo se extrae o libera fuera del organismo para varios fines de investigación (por ejemplo, en un tubo de ensayo). El término *in vitro* contrasta con el término *in vivo*.

25 Como se usa en el presente documento, el término "*ex vivo*" hace referencia a una serie de operaciones en las que las células diana en las que se va a introducir un gen se extraen de un sujeto, se introduce un gen terapéutico *in vitro* en las células y las células se devuelven al mismo sujeto.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "material derivado de célula(s)" hace referencia a cualquier material procedente de la(s) célula(s), incluyendo, entre otros, materiales que constituyen la(s) célula(s), materiales secretados por la(s) célula(s), materiales metabolizados por la(s) célula(s) o similares. Ejemplos representativos de materiales derivados de las células incluyen, entre otros, matrices extracelulares, hormonas, citocinas y similares. Los materiales derivados de las células normalmente no tienen sustancialmente efectos adversos sobre las células y sus huéspedes. Por tanto, cuando el material está contenido en un tejido protésico, una estructura tridimensional o similar, el material normalmente carece sustancialmente de efectos adversos sobre el tejido protésico, la estructura tridimensional o similar.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "matriz extracelular" (MEC) hace referencia a una sustancia que existe entre las células somáticas con independencia de si las células son células epiteliales o células no epiteliales. Las matrices extracelulares normalmente son producidas por las células y, por tanto, son materiales biológicos. Las matrices extracelulares están implicadas en el soporte de tejido, así como en la estructura ambiental interna esencial para la supervivencia de todas las células somáticas. Las matrices extracelulares generalmente son producidas por las células del tejido conjuntivo. Algunas matrices extracelulares se secretan de las células que poseen membrana basal, tales como células epiteliales o células endoteliales. Las matrices extracelulares se dividen aproximadamente en componentes fibrosos y matrices que los llenan. Los componentes fibrosos incluyen fibras de colágeno y fibras elásticas. Un componente básico de las matrices es el glucosaminoglucano (mucopolisacárido ácido), la mayor parte del cual está unido a proteínas no colagenosas para formar un polímero de un proteoglicano (complejo mucopolisacárido ácido-proteína). Además, las matrices incluyen glucoproteínas, tales como laminina de la membrana basal, microfibrillas alrededor de las fibras elásticas, fibronectinas sobre las superficies celulares y similares. Tejido particularmente diferenciado tiene la misma estructura básica. Por ejemplo, en el cartílago hialino, los condroblastos producen característicamente una gran cantidad de matrices cartilaginosas, incluyendo proteoglicanos. En los huesos, los osteoblastos producen matrices óseas que producen calcificación. En una realización de la presente invención, el tejido protésico, la estructura tridimensional o similar de la presente invención pueden ser ventajosamente similares a la composición de una matriz extracelular (por ejemplo, elastina, colágeno (por ejemplo de tipo I, de tipo IV etc.), laminina etc.) de un sitio de un órgano para el que se pretende la implantación. En la presente invención, las matrices extracelulares incluyen moléculas de adhesión celular. Como se usa en el presente documento, las expresiones "molécula de adhesión celular" y "molécula de adhesión" se usan de forma intercambiable, en referencia a una molécula capaz de mediar la unión de dos o más células (adhesión celular) o adhesión entre un sustrato y una célula. En general, las moléculas de adhesión celular se dividen en dos grupos: Moléculas implicadas en la adhesión célula-célula (adhesión intercelular) (moléculas de adhesión célula-célula) y moléculas implicadas en la adhesión célula-matriz extracelular (adhesión célula-sustrato) (moléculas de adhesión célula-sustrato). Un tejido protésico o estructura tridimensional de la presente invención normalmente comprende dicha molécula de adhesión celular. Por tanto, las moléculas de adhesión celular en el presente documento incluyen una proteína de un sustrato y una proteína de una célula (por ejemplo, integrina etc.) en una adhesión célula-sustrato. Una molécula distinta a las proteínas entra dentro del concepto de molécula de adhesión celular siempre que pueda participar en la adhesión celular.

Para la adhesión célula-célula se conocen la cadherina, una serie de moléculas que pertenecen a una superfamilia de inmunoglobulinas (NCAM1, ICAM, fasciclina II, III, etc.), la selectina y similares, cada una de ellas se sabe que se unen a las membranas celulares a través de una reacción molecular específica. Por tanto, en una realización, el tejido protésico, estructura tridimensional o similar de la presente invención tiene, preferentemente, sustancialmente la misma composición de cadherina, moléculas de la superfamilia de inmunoglobulinas o similares que la de un sitio para el cual se pretende la implantación.

Por tanto, varias moléculas están implicadas en la adhesión celular y tienen diferentes funciones. Los expertos en la técnica pueden seleccionar adecuadamente una molécula para estar contenida en un tejido protésico o estructura tridimensional de la presente invención en función de la finalidad. Las técnicas para la adhesión celular son bien conocidas como se ha descrito anteriormente y como se describe en, por ejemplo, "Saibogaimatorikkusu - Rinsho heno Oyo- [Extracellular matrix -Clinical Applications-], Medical Review.

Se puede determinar si una determinada molécula es una molécula de adhesión celular o no mediante un ensayo, como cuantificación bioquímica (un método de SDS-PAGE, un método de colágeno marcado etc.), cuantificación inmunológica (un método de enzima anticuerpo, un método de anticuerpo fluorescente, un estudio inmunohistológico etc.), un método de PCR, un método de hibridación o similares, donde se detecta una reacción positiva. Los ejemplos de dicha molécula de adhesión celular son, entre otros, colágeno, integrina, fibronectina, laminina, vitronectina, fibrinógeno, un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (por ejemplo, CD2, CD4, CD8, ICM1, ICAM2, VCAM1), selectina, cadherina y similares. La mayoría de estas moléculas de adhesión celular se transmiten a una célula una señal auxiliar para la activación celular debido a la interacción intercelular, así como adhesión celular. Por tanto, un factor de adhesión para su uso en un implante de la presente invención transmite, preferentemente, una señal auxiliar para la activación celular en una célula. Esto es porque la activación celular puede estimular el crecimiento de células presentes inicialmente o que se agregan en un tejido u órgano en un punto dañado después de la aplicación al mismo de un implante. Se puede determinar si dicha señal auxiliar se puede o no transmitir a una célula mediante un ensayo, tal como cuantificación bioquímica (un método de SDS-PAGE, un método de colágeno marcado etc.), cuantificación inmunológica (un método de enzima anticuerpo, un método de anticuerpo fluorescente, un estudio inmunohistológico etc.), un método de PCR, un método de hibridación o similares, donde se detecta una reacción positiva.

Un ejemplo de una molécula de adhesión celular es la cadherina, que está presente en muchas células capaces de fijarse al tejido. La cadherina se puede usar en una realización preferida de la presente invención. Ejemplos de una molécula de adhesión celular en las células de la sangre y el sistema inmunológico que no están fijadas a tejido incluyen, entre otros, moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas (CD 2, LFA-3, ICAM-1, CD2, CD4, CD8, ICM1, ICAM2, VCAM1, etc.); moléculas de la familia de la integrina ((LFA-1, Mac-1, gpIIbIIIa, p150, p95, VLA1, VLA2, VLA3, VLA4, VLA5, VLA6, etc.); moléculas de la familia de la selectina (L-selectina, E-selectina, P-selectina, etc.), y similares. Por tanto, dicha molécula puede ser útil para el tratamiento de un tejido u órgano de la sangre y el sistema inmunológico.

Las células no fijadas tienen que adherirse a un tejido específico para actuar sobre el tejido. En este caso, se cree que la adhesión célula-célula se potencia gradualmente a través de una primera adhesión mediante una molécula de selectina o similar, que se expresa constantemente y una segunda adhesión mediante una molécula de integrina activada posteriormente. Por tanto, en la presente invención, una molécula de adhesión celular para participar en la primera adhesión y otra molécula de adhesión celular para participar en la segunda adhesión se pueden usar juntas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "tasa de lesión tisular" hace referencia a un parámetro que indica una función de un tejido u órgano; un indicador que indica cuánto se daña un tejido u órgano tratado; y un indicador que indica si un tejido u órgano puede tener o no su función original. Los métodos para determinar una tasa de lesión tisular se conocen en la técnica. Por ejemplo, una tasa de lesión tisular se puede determinar contando los sitios de rotura de la elastina. En el presente documento, un campo visual se divide en unidades de  $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ . En cada unidad se determina la presencia o ausencia de un sitio de rotura de la elastina. Si existe un sitio de rotura de la elastina en una unidad se incrementa el recuento. Un campo visual tiene 24 unidades. Las matrices extracelulares de las secciones tisulares teñidas mediante tinción con HE se someten a inspección microscópica y recuento. El tejido no tratado se define como que tiene una tasa de lesión tisular del 0 %. Una tasa de lesión tisular se calcula mediante  $x/24$ . En este caso, el tejido no tratado corresponde a  $x=0$ .

Como se usa en el presente documento, el término "resistencia del tejido" se refiere a un parámetro que indica una función de un tejido u órgano y una resistencia física del tejido u órgano. La resistencia del tejido se puede determinar generalmente midiendo la resistencia a la tracción (por ejemplo, la resistencia de rotura, el módulo de rigidez, el módulo de Young, etc.). Dicha prueba de tracción general es bien conocida. Analizando los datos obtenidos mediante una prueba de tracción general se pueden obtener varios datos, como la resistencia a la rotura, el módulo de rigidez, el módulo de Young y similares. Estos valores se pueden usar en el presente documento como indicadores de la resistencia del tejido. Normalmente, en el presente documento se requiere resistencia del tejido que permite aplicaciones clínicas.

La resistencia a la tracción de un tejido protésico, estructura tridimensional o similar de la presente invención se puede determinar midiendo las características de estrés y distorsión del mismo. En resumen, se aplica una carga a una muestra y la distorsión resultante y la carga se introducen en respectivos convertidores A/D (por ejemplo, ELK-5000) (1 ch: distorsión, 2 ch: carga); las características de estrés y distorsión se miden para determinar la resistencia a la tracción de la muestra (Figura 40). La resistencia a la tracción también se puede determinar analizando las características de deslizamiento. Se realiza una indentación de las características de deslizamiento para investigar cómo se extiende una muestra en el tiempo mientras se aplica una carga constante a la muestra. Para materiales pequeños, materiales finos y similares se realiza una prueba de indentación usando, por ejemplo, un indentador con forma de pirámide triangular con una punta que tiene un radio de aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ . Inicialmente, el indentador es empujado al interior de una pieza de prueba de forma que se proporciona una carga a la pieza de prueba. Cuando el indentador alcanza de varias decenas de nanómetros a varios micrómetros de profundidad en la pieza de prueba, se extrae el indentador para retirar la carga. La Figura 41 muestra una carga/retirada de la curva de carga obtenida mediante el método de prueba descrita anteriormente. La rigidez, el módulo de Young o similares se pueden obtener según el comportamiento de la carga y la profundidad de empuje derivada de la curva.

En una realización preferida, la resistencia a la tracción del tejido protésico o la estructura tridimensional de la presente invención normalmente es de al menos aproximadamente un 50 % de la resistencia natural de una parte donde se pretende la implantación, preferentemente de al menos aproximadamente un 60 %, más preferentemente de al menos aproximadamente un 70 %, incluso más preferentemente de al menos aproximadamente un 80 %, y lo más preferentemente de al menos aproximadamente un 100 %.

En una realización alternativa, el tejido protésico de la presente invención puede tener una resistencia tisular de al menos aproximadamente un 75 % de la de una parte de tejido natural (por ejemplo, una parte donde se pretende una aplicación clínica (por ejemplo, corazón, etc.)), preferentemente, al menos aproximadamente un 80 %, más preferentemente, al menos aproximadamente un 85 %, e incluso más preferentemente, al menos aproximadamente un 90 %. La resistencia tisular del tejido protésico puede ser igual o superior a la del tejido natural. La resistencia tisular de un tejido natural hace referencia a una resistencia tisular poseída por un tejido de interés en su estado natural. Además del tejido membranoso, otros tejidos (por ejemplo, tejido tubular etc.) tienen, preferentemente, una resistencia tisular suficientemente fuerte. En el caso del tejido tubular, la resistencia tisular se puede representar mediante un valor  $\beta$ . En otra parte de la presente memoria descriptiva se describirá con detalle un método para calcular un valor  $\beta$  y también se ilustrará en los ejemplos siguientes. En una realización determinada, el tejido protésico de la presente invención tiene una resistencia tisular correspondiente a un valor  $\beta$  de al menos aproximadamente 15, preferentemente de al menos aproximadamente 18, más preferentemente de al menos aproximadamente 20, e incluso más preferentemente de al menos aproximadamente 22. En otra realización, el tejido protésico de la presente invención tiene un valor  $\beta$  de al menos aproximadamente el 75 % del tejido antes del tratamiento, preferentemente de al menos aproximadamente el 80 %, más preferentemente de al menos aproximadamente el 85 % e incluso más preferentemente de al menos aproximadamente el 90 %. El valor  $\beta$  del tejido protésico puede ser igual o superior al poseído originalmente por el tejido sin tratar. Una característica (por ejemplo, un valor  $\beta$ ) del tejido sin tratar hace referencia a una característica del tejido antes del tratamiento (por ejemplo, tratamiento usando el polímero 1,2-epóxido en la presente invención) (por ejemplo, en el estado natural). Por tanto, por ejemplo, si un tejido original tiene un valor  $\beta$  de 25, un tejido protésico de la presente invención puede tener, preferentemente, un valor  $\beta$  de al menos 17,5, preferentemente de al menos 20, más preferentemente de al menos 21,25 e incluso más preferentemente de al menos 22,5.

Como se usa en el presente documento, en el caso del tejido tubular, la resistencia tisular se puede representar mediante un parámetro de rigidez (valor  $\beta$ ). El valor  $\beta$  se puede calcular basándose en la expresión siguiente después de establecer la relación P-D (presión-diámetro):

$$\ln(P/P_s) = \beta (D/D_s) - 1 \quad (1)$$

donde  $P_s$  y  $D_s$  representan sus valores normales a 100 mmHg. El valor del diámetro (D) se mide bajo cada P (presión).

Ambos extremos de un tejido tubular (por ejemplo, un vaso sanguíneo etc) está cada uno fijado a una unidad de tipo tubo. El interior y el exterior del tejido se llenan con solución salina fisiológica. En esta situación se aplica presión al interior del tejido mediante un dispositivo externo, mientras se vigila el diámetro externo del tejido bajo la presión. La presión medida y el diámetro externo se sustituyen en la expresión (1) para calcular un valor  $\beta$  (Sonoda H., Takamizawa K. et al., J. Biomed. Matr. Res., 2001: 266-276).

Como se usa en el presente documento, la expresión "sustancia fisiológicamente activa" hace referencia a una sustancia capaz de actuar sobre una célula o tejido. Entre las sustancias fisiológicamente activas se incluyen citocinas y factores de crecimiento. Una sustancia fisiológicamente activa celular puede ser de origen natural o sintético. Preferentemente, una sustancia fisiológicamente activa celular es una que es producida por una célula o una que tiene una función similar a ella. Como se usa en el presente documento, una sustancia fisiológicamente activa celular puede estar en forma de una proteína o un ácido nucleico o en otras formas. En la práctica real, las

sustancias celulares fisiológicamente activas son normalmente proteínas. En la presente invención, una sustancia fisiológicamente activa puede usarse, por ejemplo, para estimular la afinidad de un tejido protésico implantado de la presente invención.

5 El término "citocina" se usa en el presente documento en el sentido más amplio en la técnica y hace referencia a una sustancia fisiológicamente activa que se produce en una célula y actúa en la misma célula o en una diferente. Generalmente, las citocinas son proteínas o polipéptidos que tienen una función de controlar una respuesta inmunológica, regular el sistema endocrino, regular el sistema nervioso, actuar contra un tumor, actuar contra un virus, regular el crecimiento celular, regular la diferenciación celular o similares. En el presente documento, las  
10 citocinas están en forma de una proteína o un ácido nucleico o en otras formas. En la práctica real, las citocinas normalmente son proteínas.

Las expresiones "factor de crecimiento" o "factor de crecimiento celular" se usan en el presente documento de forma intercambiable y cada una hace referencia a una sustancia que estimula o controla el crecimiento celular. Los  
15 factores de crecimiento también se denominan "factores de proliferación" o "factores de desarrollo". Los factores de crecimiento pueden añadirse al medio de cultivo celular o tisular sustituyendo por macromoléculas séricas. Se ha revelado que una serie de factores de crecimiento tienen una función de controlar la diferenciación además de una función de estimular el crecimiento celular.

20 Ejemplos de citocinas incluyen de forma representativa, entre otros, interleucinas, quimiocinas, factores hematopoyéticos tales como factores estimulantes de las colonias, un factor de necrosis tumoral, interferones, un factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), un factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), un factor de crecimiento endotelial (VEGF), cardiotrofina y similares, que tienen actividad de proliferación.

25 Las sustancias celulares fisiológicamente activas, tales como citocinas, factores de crecimiento y similares normalmente tienen redundancia de su función. De acuerdo con lo anterior, la referencia en el presente documento a una citocina o factor de crecimiento concreto mediante un nombre o función también incluye cualquier otro nombre o función por el cual lo conocen los expertos en la técnica, siempre que el factor tenga la actividad de una sustancia celular fisiológicamente activa para su uso en la presente invención. Las citocinas o factores de crecimiento se  
30 pueden usar en un agente terapéutico o farmacéutico de acuerdo con una realización preferida de la presente invención, siempre que tengan actividad preferible como se describe en el presente documento.

Por tanto, en una realización de la presente invención se reveló que cuando dicha citocina o factor de crecimiento  
35 (por ejemplo, HGF) se proporciona a un lugar de implantación (por ejemplo, un lugar de implantación del miocardio etc.) junto con un tejido protésico o estructura tridimensional de la presente invención, se observan la afinidad del tejido protésico o estructura tridimensional y una mejora de la función del lugar de implantación. Por tanto, la presente invención también proporciona dicha terapia combinada.

40 Como se usa en el presente documento, el término "diferenciación" hace referencia a un proceso de desarrollo del estado de las partes compuestas de organismos, tales como células, tejidos u órganos, y un proceso en el cual se forma un tejido u órgano característico. El término "diferenciación" se usa principalmente en embriología, biología del desarrollo y similares. En los organismos se forman varios tejidos y órganos a partir de divisiones de un huevo fertilizado (una única célula) hasta un adulto. En estadios tempranos del desarrollo (es decir, antes de la división celular o después de una división celular insuficiente), cada célula o grupo celular no tiene una característica morfológica o funcional y no es muy distinguible. Dicho estado se denomina "indiferenciado". La "diferenciación" se  
45 puede producir a nivel de órganos. Una célula que constituye un órgano se puede desarrollar en varias células o grupos de células que tienen diferentes características. Este fenómeno también se denomina diferenciación en un órgano en la formación del órgano. Por tanto, un tejido protésico o estructura tridimensional de la presente invención puede comprender un tejido que incluye células diferenciadas.

Como se usa en el presente documento, los términos "implante", "injerto" e "injerto tisular" se usan de forma intercambiable en relación con tejido homólogo o heterólogo o un grupo celular o un material artificial, que se inserta  
55 en un sitio concreto de un cuerpo y, después, forma una parte del cuerpo. Por tanto, un tejido protésico o estructura tridimensional de la presente invención se puede usar como implante. Entre los ejemplos de injertos convencionales se incluyen órganos o partes de órganos, vasos sanguíneos, tejido de tipo vaso sanguíneo, corazón, válvulas cardíacas, pericardio y similares. Por tanto, los injertos abarcan uno cualquier de estos que se inserta en una parte deficiente para compensar la deficiencia. Los injertos incluyen, entre otros, autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos, que dependen del tipo de su donante.

60 Como se usa en el presente documento, el término "autoinjerto" (un tejido, una célula, un órgano etc.) hace referencia a un injerto (un tejido, una célula, un órgano etc.) que se implanta en el mismo individuo del que deriva el injerto. Como se usa en el presente documento, el término "autoinjerto" (un tejido, una célula, un órgano etc.) puede abarcar un injerto de un individuo genéticamente idéntico (por ejemplo, un gemelo idéntico) en un sentido amplio.  
65 Como se usa en el presente documento, los términos "autólogo" y "derivado de un sujeto" se usan de forma intercambiable. Por tanto, la expresión "no derivado de un sujeto" en relación con un injerto indica que el injerto no

es antólogo (es decir, heterólogo).

5 Como se usa en el presente documento, el término "aloinjerto" (un tejido, una célula, un órgano etc.) hace referencia a un injerto (un tejido, una célula, un órgano etc.) que se implanta en un individuo que es de la misma especie pero es genéticamente diferente del que deriva el injerto. Dado que un aloinjerto (un tejido, una célula, un órgano etc.) es genéticamente diferente de un individuo (receptor) donde se implanta el injerto, el injerto puede provocar una reacción inmunológica. Dicho injerto (un tejido, una célula, un órgano etc.) incluye, entre otros, por ejemplo, un injerto (un tejido, una célula, un órgano etc.) derivado de un padre.

10 Como se usa en el presente documento, el término "xenoinjerto" (un tejido, una célula, un órgano etc.) hace referencia a un injerto (un tejido, una célula, un órgano etc.) que se implanta de una especie diferente. Por tanto, por ejemplo, cuando un ser humano es un receptor, un injerto derivado de porcino (un tejido, una célula, un órgano etc.) se denomina xenoinjerto (un tejido, una célula, un órgano etc.).

15 Como se usa en el presente documento, "receptor" (aceptor) hace referencia a un individuo que recibe un injerto (un tejido, una célula, un órgano etc.) o materia implantada (un tejido, una célula, un órgano etc.) y también se denomina "huésped". Por el contrario, un individuo que proporciona un injerto (un tejido, una célula, un órgano etc.) o materia implantada (un tejido, una célula, un órgano etc.) se denomina "donante" (proveedor).

20 Con una técnica de formación de tejido protésico de la presente invención se puede usar un tejido protésico derivado de células madre mesenquimatosas. Esto es porque un tejido protésico (por ejemplo, tejidos membranosos, órganos etc.) formado mediante el método de la presente invención puede exhibir una función deseada mientras que la tasa de lesión tisular se mantiene a un nivel que no interfiere con la terapia (es decir, un nivel bajo). Convencionalmente, los tejidos u órganos se usan como injertos sin modificar. Por el contrario, la presente invención proporciona un  
25 tejido que comprende células conectadas tridimensionalmente. Dicho tejido protésico tridimensional no se puede conseguir mediante técnicas convencionales y, por tanto, constituye un efecto significativo de la presente invención.

30 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" hace referencia a un organismo al que se aplica el tratamiento de la presente invención y también se denomina "paciente". Un paciente o sujeto puede ser, preferentemente, un ser humano.

35 Las células usadas opcionalmente en un tejido protésico, estructura tridimensional o injerto tisular de la presente invención pueden derivar de un origen singeneico (origen propio=, un origen alogénico (origen no propio) o un origen heterólogo. En vista de las reacciones de rechazo, son preferibles las células singeneicas. Si las reacciones de rechazo no producen problemas se pueden usar células alogénicas. Las células que provocan reacciones de rechazo se pueden usar tratando opcionalmente las células de un modo que superen las reacciones de rechazo. Los procedimientos para evitar reacciones de rechazo se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Shin Gekagaku Taikei, Dai 12 Kan, Zoki Ishoku (Shinzo Ishoku Hai Ishoku Gijutsuteki, Rinriteki Seibi kara Jisshi ni Mukete [New Whole Surgery, Vol. 12, Organ Transplantation (Heart Transplantation Lung Transplantation From Technical and Ethical Improvements to Practice)" (3ª edición revisada.), Nakayama Shoten]. Entre los ejemplos de dichos métodos se incluyen un método que usa inmunosupresores o fármacos esteroideos y similares. Por ejemplo, actualmente  
40 existen los siguientes inmunosupresores para prevenir las reacciones de rechazo: "ciclosporina" (SANDIMMUNE/NEORAL); "tacrolimus" (PROGRAF); "azatioprina" (IMURAN); "hormona esteroidea" (prednina, metilprednina); y "anticuerpos frente a linfocitos T" (OKT3, ATG, etc.). Un método que se usa en todo el mundo como  
45 terapia de inmunosupresión preventiva en muchas instalaciones es el uso simultáneo de tres fármacos: ciclosporina, azatioprina y hormona esteroidea. Un inmunosupresor se administra deseablemente de forma concurrente con un agente farmacéutico de la presente invención. La presente invención no está limitada a esto. Un inmunosupresor se puede administrar antes o después de un método de regeneración/terapéutico de la presente invención siempre que se pueda conseguir un efecto de inmunosupresión.

50 Las células usadas en la presente invención pueden derivarse de cualquier organismo (por ejemplo, vertebrados e invertebrados). Preferentemente se usan células derivadas de vertebrados. Más preferentemente se usan células derivadas de mamíferos (por ejemplo, primates, roedores etc.). Incluso más preferentemente se usan células derivadas de primates. Lo más preferentemente se usan células derivadas de un ser humano. Normalmente se  
55 usan, preferentemente, células de la misma especie que el huésped.

60 Entre los ejemplos de un sujeto tratado mediante un tejido protésico de la presente invención se incluyen el corazón que sufre una cardiopatía (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, cardiopatías isquémicas, infarto de miocardio, miocardiopatía, miocarditis, miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía hipertrófica dilatada y miocardiopatía dilatada), vasos sanguíneos en un parche pericárdico, miocardio infartado extremidades inferiores y superiores, y similares.

65 Los tejidos objeto de la presente invención pueden ser cualquier órgano de un organismo y pueden derivar de cualquier organismo. Los ejemplos de organismos dirigidos por la presente invención incluyen vertebrados e invertebrados. Preferentemente, los organismos objetivo de la presente invención son mamíferos (por ejemplo, primates, roedores etc.). Más preferentemente, los organismos objeto de la presente invención son primates. Lo más

preferentemente, los organismos objeto de la presente invención son seres humanos.

5 Cuando un tejido protésico, estructura tridimensional o similar de la presente invención se usa como una válvula se pueden usar técnicas bien conocidas en la materia para uso general de válvulas protésicas para implantar el tejido protésico o similar. Por ejemplo, en la técnica se conocen bien válvulas de tejido heterólogo sin endoprótesis. Por ejemplo, se conocen válvulas de tejido heterólogo sin endoprótesis. En las válvulas de tejido heterólogo, la presencia de una endoprótesis reduce el área eficaz del puerto de la válvula, que conduce a la calcificación o degeneración de las valvas de la válvula. Recientemente, usando la morfología de la parte de la base de la aorta porcina, una endoprótesis de válvula de tejido heterólogo sin endoprótesis ha atraído la atención como válvula protésica para la 10 válvula aórtica (Gross C., et al., Ann. Thorac. Surg., 68:919, 1999). Se considera que la ausencia de una endoprótesis tiene como resultado una pequeña diferencia de presión a través de la válvula, incluso cuando inevitablemente se usa una válvula de pequeño tamaño y también es eficaz para el agrandamiento postoperatorio del ventrículo izquierdo. Adicionalmente, la elasticidad de la parte de base de la aorta se mantiene, el estrés a la cúspide es pequeño y cabe esperar que la durabilidad mejore en comparación con una válvula de tejido con una endoprótesis. Adicionalmente se pueden usar válvulas de tejido heterólogo sin endoprótesis en el caso de endocarditis debido a infección o infección de la válvula protésica. En la actualidad, se han notificado resultados postoperatorios a plazo medio sustancialmente satisfactorios de válvulas de tejido heterólogo sin endoprótesis en EE.UU. y Europa, y cabe esperar que los resultados a largo plazo sean satisfactorios (Gross C., et al., Ann. Thorac. Surg., 68:919, 1999).

20 Como se usa en la presente invención, la expresión "tamaño grande" en relación con un tejido protésico hace referencia al tamaño de una parte del mismo que no tiene poros. Representativamente, la expresión "tamaño grande" significa que la longitud en una dirección longitudinal de una parte que no tiene poros es de al menos 1 cm, preferentemente de al menos 1,5 cm e incluso más preferentemente de al menos 2 cm. En este caso, la longitud en una dirección transversal del mismo también es de al menos 1 cm, preferentemente de al menos 1,5 cm e incluso más preferentemente de al menos 2 cm. La presente invención no está limitada a esto. Cuando un "tamaño grande" está representado por el área de un tejido protésico, el área de un círculo inscrito en una parte que no tiene poros es normalmente de al menos 1 cm<sup>2</sup>, preferentemente de al menos 2 cm<sup>2</sup>, más preferentemente de al menos 3 cm<sup>2</sup>, incluso más preferentemente de al menos 4 cm<sup>2</sup>, incluso todavía más preferentemente de al menos 5 cm<sup>2</sup> y lo más preferentemente de al menos 6 cm<sup>2</sup>.

35 Como se usa en el presente documento, el término "flexibilidad" en relación con un tejido protésico hace referencia a una capacidad para aguantar estímulos físicos procedentes de ambientes externos (por ejemplo, presión). Un tejido protésico que tiene flexibilidad es preferible cuando el lugar de implantación se mueve o se deforma de modo autónomo o mediante efectos externos. Por tanto, dicho tejido protésico que tiene flexibilidad conserva, preferentemente, flexibilidad después de la implantación.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "extensibilidad y contractibilidad" en relación con un tejido protésico hace referencia a una capacidad para aguantar estímulos de extensión o contracción procedentes de ambientes externos (por ejemplo, pulsación). Un tejido protésico que tiene extensibilidad y contractibilidad es preferible cuando el lugar de implantación se somete a estímulos de extensión o contracción. Los ejemplos de lugares de implantación, que se someten a estímulos de extensión o contracción, incluyen, entre otros, corazón, músculo, articulación, cartilago, tendón y similares. En una realización puede requerirse extensibilidad y contractibilidad capaces de aguantar el movimiento de pulsación del corazón.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "parte distinta del miocardio de un adulto" hace referencia a cualquier parte, tejido, célula u órgano distinto del miocardio del corazón diferenciado terminalmente. Los ejemplos de dichas partes, tejidos, células y órganos incluyen, entre otros, mioblastos esqueléticos, fibroblastos, células sinoviales, células madre y similares. Estas células no tienen un marcador característico de las células derivadas del miocardio del corazón adulto. Dicho marcador (en lo sucesivo en el presente documento denominado "marcador de miocardio adulto") puede estar en forma de una molécula de ácido nucleico (expresión de ARNm), una proteína, una matriz extracelular, un fenotipo específico, una forma específica de una célula o similar. Por tanto, los marcadores de miocardio adulto que no se especifican en el presente documento se pueden usar para identificar un tejido protésico de la presente invención siempre que estos marcadores puedan indicar células derivadas del miocardio de un adulto. Los ejemplos representativos de partes distintas del miocardio de un adulto incluyen, entre otros, partes del corazón distintas del miocardio de adulto, partes que contienen células madre mesenquimatosas o células derivadas de las mismas, otros tejidos, otros órganos, mioblastos (por ejemplo, mioblastos esqueléticos), fibroblastos, células sinoviales y similares. Por tanto, identificando un marcador específico característico de otras partes distintas al miocardio de un adulto, se pueden confirmar las partes distintas al miocardio.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "parte distinta del corazón de un adulto" hace referencia a cualquier parte, tejido, célula u órgano distinto del corazón diferenciado terminalmente. Los ejemplos de dichas partes, tejidos, células y órganos incluyen, entre otros, mioblastos esqueléticos, fibroblastos, células sinoviales, células madre y similares. Estas células no tienen un marcador característico de las células derivadas del corazón adulto. Dicho marcador puede estar en forma de una molécula de ácido nucleico (expresión de ARNm), una proteína, una matriz extracelular, un fenotipo específico, una forma específica de una célula o similar. Por tanto, los

5 marcadores de corazón adulto que no se especifican en el presente documento se pueden usar para identificar un tejido protésico de la presente invención siempre que estos marcadores puedan indicar células derivadas del corazón de adulto. Los ejemplos representativos de partes distintas del corazón de un adulto incluyen, entre otros, partes que contienen células madre mesenquimatosas o células derivadas de las mismas, otros tejidos, otros

10 Una “parte distinta al miocardio de un adulto” y una “parte distinta del corazón de un adulto” se pueden identificar usando marcadores característicos de células derivadas del miocardio de un adulto o del corazón de un adulto, incluyendo mioblastos esqueléticos, fibroblastos, células sinoviales, células madre o similares (en lo sucesivo en el presente documento denominado “marcador de miocardio no adulto” o “marcador de corazón no adulto”, respectivamente). Si el marcador se expresa en menos de aproximadamente el 100 %, preferentemente menos de aproximadamente el 80 %, más preferentemente menos de aproximadamente el 50 %, incluso más preferentemente

15 menos de aproximadamente el 25 %, en algunos casos menos de aproximadamente el 1 %, se pueden identificar las partes descritas anteriormente. Los ejemplos de dichos marcadores incluyen, entre otros, cadena pesada IIa de la miosina, cadena pesada IIb de la miosina, cadena pesada IIc de la miosina (IIx), CD56, MyoD, Myf5, miogenina y similares. Por tanto, los marcadores de miocardio no adulto que no se especifican en el presente documento se pueden usar para identificar un tejido protésico de la presente invención siempre que estos marcadores puedan indicar células derivadas de partes distintas al corazón de un adulto.

25 cadena pesada IIa de la miosina (humana: N° de acceso NM\_017534; SEC ID N° 1 y 2), cadena pesada IIb de la miosina (humana: N° de acceso NM\_017533; SEC ID N° 3 y 4), cadena pesada IIc (IIx) de la miosina (humana: N° de acceso NM\_005963; SEC ID N° 5 y 6) son marcadores específicos de mioblastos (Havenith M.G., Visser R., Schrijvers-van Schendel J.M., Bosman F.T., "Muscle Fiber Typing in Routinely Processed Skeletal Muscle With Monoclonal Antibodies", Histochemistry, 1990; 93(5):497-499). Estos marcadores se pueden confirmar principalmente observando la presencia de proteínas. Un anticuerpo contra la cadena pesada IIa de la miosina, la cadena pesada IIb de la miosina y la cadena pesada IIc (IIx) de la miosina es, por ejemplo, MY-32 disponible en Sigma. Este anticuerpo es específico del músculo esquelético y no se une al miocardio (Webster C., Pavlath G.K., Parks D.R., Walsh F.S., Blau H.M., Exp. Cell. Res., 1988 Jan; 174(1):252-65; y Havenith M.G., Visser R., Schrijvers-van Schendel J.M., Bosman F.T., Muscle Fiber Typing in Routinely Processed Skeletal Muscle with Monoclonal

30 Antibodies, Histochemistry, 1990, 93(5):497-499).

CD56 (humano: N° de acceso U63041; SEC ID N° 7 y 8) es un marcador específico de mioblastos. Este marcador se puede confirmar principalmente observando la presencia de ARNm.

40 MyoD (humano: N° de acceso X56677; SEC ID N° 9 y 10) es un marcador específico de mioblastos. Este marcador se puede confirmar principalmente observando la presencia de ARNm.

Myf5 (humano: N° de acceso NM\_005593; SEC ID N° 11 y 12) es un marcador específico de mioblastos. Este marcador se puede confirmar principalmente observando la presencia de ARNm.

45 Miogenina (humana: N° de acceso BT007233; SEC ID N° 13 y 14) es un marcador específico de mioblastos. Este marcador se puede confirmar principalmente observando la presencia de ARNm.

50 En otras realizaciones se pueden usar otros marcadores específicos de otros tejidos. Los ejemplos de dichos marcadores incluyen, entre otros, Oct-3/4, SSEA-1, Rex-1, Otx2, y similares para células madre embrionarias; VE-cadherina, Flk-1, Tie-1, PECAM1, vWF, c-kit, CD34, Thy1, Sca-1, y similares para células endoteliales;  $\alpha$ -actina de músculo esquelético además de los marcadores descritos anteriormente para músculos esqueléticos; Nestina, receptor de Glu, receptor de NMDA, GFAP, neuregulina-1, y similares para células nerviosas; c-kit, CD34, Thyl, Sca-1, GATA-1, GATA-2, FOG, y similares para células hematopoyéticas.

55 Como se usa en el presente documento, el término “derivado” en relación con las células significa que las células se separan, aíslan o extraen de una masa celular, tejido u órgano donde las células han estado originalmente presentes o que las células son inducidas por las células madre.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión “aplicable al corazón” significa que el corazón aplicado tiene la capacidad de pulsar. Un tejido aplicable al corazón tiene una resistencia tal que el tejido puede aguantar la dilatación y la contracción del corazón pulsátil. En el presente documento, la aplicabilidad al corazón incluye la aplicabilidad al miocardio. La aplicabilidad al corazón se puede determinar confirmando que un receptor que tiene un injerto implantado sobrevive.

Como se usa en el presente documento, la expresión “estructura tridimensional” hace referencia a un objeto que comprende células que tienen conexión eléctrica intracelular y alineación, y se extiende tridimensionalmente. La expresión “estructura tridimensional” abarca objetos que tienen cualquier forma (por ejemplo, forma de lámina etc.). Una estructura con forma de lámina comprende una única capa o una pluralidad de capas.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión “lámina celular” se refiere a una estructura que comprende una monocapa de células. Dicha lámina celular tiene al menos una conexión biológica bidimensional. La lámina que tiene conexión biológica se **caracteriza por que** después de producir la lámina, la conexión entre las células no se destruye sustancialmente incluso cuando la lámina se manipula individualmente. Dicha conexión biológica incluye  
10 conexión intracelular a través de una matriz extracelular.

Como se usa en el presente documento, la expresión “conexión biológica” respecto a la relación entre células significa que hay determinada interacción entre las células. Los ejemplos de dicha interacción incluyen, entre otros, interacción a través de moléculas biológicas (por ejemplo, matriz extracelular), interacción a través de la transducción de señal, interacción eléctrica (conexión eléctrica, tal como sincronización de señales eléctricas o similares) y similares. Con el fin de confirmar la interacción se usa un ensayo adecuado para una característica de la interacción. Con el fin de confirmar la interacción física a través de moléculas biológicas se mide la resistencia de un tejido protésico, una estructura tridimensional o similar (por ejemplo, una prueba de tracción). Con el fin de confirmar la interacción a través de la transducción de la señal se investiga la expresión génica o similar. Con el fin de  
20 confirmar la interacción eléctrica, se mide el potencial eléctrico de un tejido protésico, una estructura tridimensional o similar para determinar si el potencial eléctrico se propaga o no con ondas constantes. Por tanto, preferentemente, la conexión física se puede determinar observando si la conexión se establece o no sin un armazón. En la presente invención, normalmente es suficiente que se proporcione al menos una conexión biológica bidimensional. En una realización preferida, es ventajoso que se proporcione una conexión biológica tridimensional. En este caso se puede formar una estructura tridimensional. Preferentemente, existe conexión biológica sustancialmente uniformemente en todas las direcciones en el espacio tridimensional. En otra realización, se puede usar el tejido protésico, una estructura tridimensional y similar, que tiene conexión biológica bidimensional sustancialmente uniforme y conexión biológica ligeramente más débil en la tercera dimensión.

30 Un tejido protésico, una estructura tridimensional o similar de la presente invención se puede proporcionar usando métodos de preparación conocidos, como un producto farmacéutico o, como alternativa, como un fármaco para animales, unseudofármaco, un fármaco marino, un producto cosmético y similares.

Los animales objetivo de la presente invención incluyen cualquier organismo siempre que tenga órganos (por ejemplo, animales (por ejemplo, vertebrados, invertebrados)). Preferentemente, el animal es vertebrado (por ejemplo, mixiniiformes, petronyzoniformes, condichthyes, osteichthyes, anfibios, reptiles, aves, mamíferos, etc.), más preferentemente mamíferos (por ejemplo, monotremados, marsupiales, edentados, dermópteros, quirópteros, carnívoros, insectívoros, proboscídeos, perisodáctilos, artiodáctilos, tubulidentados, folidotas, sirénidos, cetáceos, primates, roedores, lagomorfos etc.). Ejemplos ilustrativos de un sujeto incluyen, entre otros, animales, tales como ganado vacuno, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros y similares. Más preferentemente, se usan primates (por ejemplo, chimpancé, mono japonés, humano etc.). Lo más preferentemente se usa un ser humano. Esto es porque existe limitación a las terapias de implantación.

45 Cuando la presente invención se usa como agente farmacéutico, puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable o similar. Un vehículo farmacéuticamente aceptable contenido en un medicamento de la presente invención incluye cualquier material conocido en la técnica.

Ejemplos de dicho vehículo farmacéuticamente aceptable incluyen, entre otros, antioxidantes, conservantes, colorantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, agentes de suspensión, disolventes, cargas, agentes espesantes, tampones, vehículos de liberación, adyuvantes agrícolas o farmacéuticos, y similares.

Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente la cantidad de un agente farmacéutico (por ejemplo, un tejido protésico, un compuesto farmacéutico usado junto con el mismo etc.) usada en el método de tratamiento de la presente invención con referencia a la finalidad de uso, una enfermedad diana (tipo, gravedad y similares), la edad del paciente, el peso, el sexo y el historial de casos, la forma o tipo de la célula y similares. La frecuencia del método de tratamiento de la presente invención aplicado a un sujeto (o paciente) también la determinan los expertos en la técnica con respecto a la finalidad de uso, la enfermedad objetivo (tipo, gravedad y similar), la edad del paciente, el peso, el sexo y el historial de casos, la progresión de la terapia y similares. Ejemplos de la frecuencia incluyen de una vez al día a varios meses (por ejemplo, de una vez a la semana a una vez al mes). Preferentemente, la administración se realiza de una vez a la semana o mes con referencia a la progresión.

65 Como se usa en el presente documento, el término “administrar” en relación con un tejido protésico, estructura tridimensional o similar de la presente invención o un agente farmacéutico que lo comprende significa que se administrar de forma individual o en combinación con otros agentes terapéuticos. Un tejido protésico de la presente invención se puede introducir en los puntos de terapia (por ejemplo, corazón deteriorado etc.) mediante los siguientes métodos, en las formas siguientes y en las cantidades siguientes. Los ejemplos de los métodos de

introducción incluyen, entre otros, fijación directa, sutura tras fijación, inserción y similares. Por ejemplo, un tejido protésico y una estructura tridimensional de la presente invención se puede aplicar mediante los métodos descritos anteriormente en una zona deteriorada de tejido miocárdico isquémico causada por infarto de miocardio, angina de pecho o similares. Las combinaciones se pueden administrar de forma concomitante (por ejemplo como una mezcla) por separado pero simultánea o concurrentemente, o de forma secuencial. Esto incluye presentaciones en las que los agentes combinados se administran juntos como una mezcla terapéutica y, también, procedimientos en los cuales los agentes combinados se administran por separado pero de forma simultánea (por ejemplo, un tejido protésico o similar se proporciona directamente mediante operación mientras que otros agentes farmacéuticos se proporcionan mediante inyección intravenosa). La administración “en combinación” incluye además la administración separada de uno de los compuestos o agentes administrados primero, seguido del segundo.

Como se usa en el presente documento, el término “refuerzo” significa que se mejora la función de una parte objetivo de un organismo.

Como se usa en el presente documento, el término “instrucciones” describen un método de administrar un medicamento, un método para diagnóstico o similares de la presente invención para personas que administren, o a las que se administre, el medicamento o similar o para persona que diagnostiquen o que se le diagnostique (por ejemplo, médicos, pacientes y similares). Las instrucciones describen una declaración que indica un método adecuado para administrar un diagnóstico, un medicamento o similar de la presente invención. Las instrucciones se preparan de acuerdo con un formato definido por una autoridad de un país donde se pone en práctica la presente invención (por ejemplo el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar de Japón, la Administración de Alimentos y Fármacos de EE.UU. (FDA) y similares), que describa explícitamente que las instrucciones están aprobados por la autoridad. Las instrucciones son la denominada ficha técnica y normalmente se proporcionan en medio de papel. Las instrucciones no están tan limitadas y se pueden proporcionar en forma de medios electrónicos (por ejemplo, sitios web, correos electrónicos y similares proporcionados en Internet).

Como se usa en el presente documento, la expresión “macromolécula respondedora a estímulos” hace referencia a una macromolécula que cambia de forma y/o de propiedad en respuesta a un estímulo, es decir los cambios se producen entre antes y después del estímulo. Los ejemplos de dicho estímulo incluyen, entre otros, la exposición a la luz, la aplicación de campo eléctrico, un cambio en la temperatura, un cambio en el pH, la adición de una sustancia química, y similares. Los ejemplos de macromoléculas respondedoras a estímulo incluyen, entre otros, poli(N-isopropilacrilamida), copolímero de poli(N-isopropilacrilamida-ácido acrílico), copolímero de poli(N-isopropilacrilamida-metilmetacrilato), copolímero de poli(N-isopropilacrilamida-acrilato sódico), copolímero de poli(N-isopropilacrilamida-vinilferroceno), poli(vinilmetiléter) (PVME) expuesto a rayos  $\gamma$ , poli(oxietileno), una resina obtenida incorporando un material biológico (por ejemplo, ácido nucleico, etc.) en una macromolécula, y un gel obtenido mediante reticulación de las macromoléculas descritas anteriormente con un agente de reticulación y similares.

Como se usa en el presente documento, la expresión “macromolécula respondedora a la temperatura” se refiere a una macromolécula que cambia su forma y/o propiedad en respuesta a la temperatura. Los ejemplos de macromoléculas respondedoras a la temperatura incluyen, entre otros, poli(N-isopropilacrilamida), copolímero de poli(N-isopropilacrilamida-ácido acrílico), copolímero de poli(N-isopropilacrilamida-metilmetacrilato), copolímero de poli(N-isopropilacrilamida-acrilato sódico), poli(vinilmetiléter) (PVME) expuesto a rayos  $\gamma$ , poli(oxietileno), y un gel obtenido mediante reticulación de las macromoléculas descritas anteriormente con un agente de reticulación y similares. Los ejemplos preferidos de macromoléculas respondedoras a la temperatura incluyen, entre otros, poli(N-isopropilacrilamida), copolímero de poli(N-isopropilacrilamida-metacrilato de metilo), copolímero de poli(N-isopropilacrilamida-acrilato sódico) y un gel obtenido mediante reticulación de las macromoléculas descritas anteriormente con un agente de reticulación y similares. Por ejemplo, una macromolécula respondedora a la temperatura usada en el presente documento tiene una temperatura de solución crítica superior o inferior a la del agua de 0 °C a 80 °C. La presente invención no está limitada a esto. La expresión “temperatura de solución crítica” se refiere a un umbral de temperatura que cambia una forma y/o propiedad. Preferentemente, en el presente documento se puede usar poli(N-isopropilacrilamida).

Por ejemplo, el polivinilmetiléter expuesto a rayos  $\gamma$  forma un hidrato a temperatura ambiente en solución acuosa que, a su vez, se hincha. Se sabe que a medida que la temperatura aumenta, la sustancia se deshidrata, de forma que la solución se contrae y se convierte en un gel de macromolécula sensible al calor. El gel de PVME, que es uniforme y transparente como una gelatina, se vuelve turbio (es decir, cambia su transparencia) si se calienta. Si el gel se proporciona con una estructura porosa o se conforma en fibras o partículas, el gen se puede extender o contraer a una velocidad alta. Se cree que un gel de PVME poroso y de tipo fibra puede extenderse o contraerse en menos de un segundo (véase <http://www.aist.go.jp/NIMC/overview/v27-j.html>, publicación japonesa abierta a consulta por el público n° 2001-213992 y publicación japonesa abierta a consulta por el público n° 2001-131249). El gen de N-isopropilacrilamida (es decir, poli(N-isopropilacrilamida) también se conoce como un gel respondedor a la temperatura. Si la poli(N-isopropilacrilamida) se copolimeriza con un monómero hidrofóbico, la temperatura que le permite cambiar su forma y/o propiedad se puede reducir. Si la poli(N-isopropilacrilamida) se copolimeriza con un monómero hidrofílico, la temperatura que le permite cambiar su forma y/o propiedad se puede aumentar. Usando este carácter, es posible preparar una carga respondedora a un estímulo deseado. Dicha técnica se puede aplicar

a otras macromoléculas respondedoras a la temperatura.

Como se usa en el presente documento, la expresión “enzima de degradación de proteínas” tiene el mismo significado que se usa habitualmente en la técnica y hace referencia a una enzima que cataliza la degradación de las proteínas. Esta enzima también se denomina “proteasa”.

Como se usa en el presente documento, la expresión “película de matriz regular” hace referencia a una película que tiene una estructura donde los elementos se disponen según una norma determinada. Los ejemplos de la estructura de dicha película incluyen, entre otros, estructura en panal, estructura en línea, estructura en puntos y similares. Un tejido protésico de la presente invención preferentemente se produce con dicha matriz regular. La película puede estar hecha de un material biodegradable (por ejemplo, ácido poli-L-láctico (PLLA), etc.). Con el fin de producir una película elástica se puede usar (poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) o similar.

En la ingeniería celular, ingeniería tisular o similar, el cultivo celular suele requerir material de base para las células del armazón. Se sabe que la interacción célula-célula se ve afectada no solo por las propiedades químicas de las superficies celulares sino también por la forma diminuta de las células. Para el fin de controlar las funciones celulares, es importante diseñar tanto las propiedades químicas de las superficies del material en contacto con las células como la estructura diminuta de las células. Se ha revelado que en las películas porosas que tienen estructura en panal, el patrón en panal proporciona una superficie de adhesión celular y la estructura porosa proporciona acceso a las bases que soportan las células y las vías de suministro de nutrientes. Por tanto, es preferible usar la estructura en panal.

La película con estructura en panal se puede usar como base para organizar las células en un órgano protésico o un tejido protésico, por ejemplo. Puede que se desee que dicho órgano o tejido protésico o similar se absorba en el cuerpo. Por tanto, la base se absorbe, deseablemente, en el cuerpo después de un determinado periodo de tiempo. Los materiales convencionales, que tienen una estructura en panal, mantienen de forma estable la estructura durante un periodo de tiempo necesario para cultivo celular y, después, se degradan, se describen en, por ejemplo, la publicación japonesa abierta a consulta por el público nº 2001-157574, la publicación japonesa abierta a consulta por el público nº 2002-335949, y similares.

La publicación japonesa abierta a consulta por el público nº 2001-157574 divulga una estructura en panal y una película que consiste en la estructura en panal. La estructura en panal se obtiene del siguiente modo. Una solución de disolvente orgánico hidrofóbico que consiste en de 50 a 99 % en peso/peso de un polímero biodegradable y de 50 a 1 % en peso/peso de un polímero antipático se vierte sobre un sustrato en atmósfera que tiene una humedad relativa del 50 al 95 %, seguido de evaporación gradual del disolvente orgánico y la concurrente condensación de rocío sobre la superficie de la solución vertida. Las pequeñas gotas de rocío causadas por la condensación se evaporan. Como resultado se obtiene una estructura en panal. La publicación japonesa abierta a consulta por el público nº 2002-335949 describe que la película descrita anteriormente que tiene una estructura en panal se puede usar para formar una agregación tridimensional de células organizadas en orden que es similar al tejido biológico.

Una película se produce del siguiente modo. Una solución de disolvente orgánico hidrofóbico de un único polímero biodegradable y antipático o una mezcla de polímeros que contiene un polímero biodegradable y un polímero anfipático se vierte sobre un sustrato, seguido de la evaporación del disolvente orgánico y la condensación de rocío concurrente sobre la superficie de la solución vertida. Las pequeñas gotas de rocío causadas por la condensación se evaporan.

Se puede usar un único polímero biodegradable y antipático o, como alternativa, una mezcla de polímeros que contiene una pluralidad de polímeros que incluyen polímero(s) biodegradables y polímero(s) anfipáticos.

Como polímeros biodegradables que se pueden usar en la presente invención, a la luz de la solubilidad en disolventes orgánicos son preferibles los poliésteres alifáticos biodegradables (por ejemplo, poli(ácido láctico), poli(ácido hidroxibutírico), policaprolactona, poli(adipato de etileno), poli (adipato de butileno), etc.), policarbonato alifático (carbonato de polibutileno, carbonato de polietileno etc.) y similares. En particular, a la luz de la disponibilidad, el precio y similares son deseables el poli(ácido láctico) y la policaprolactona.

Los polímeros anfipáticos que se pueden usar son preferentemente no tóxicos a la luz de su uso como material base para el cultivo celular. Los ejemplos de dichos polímeros anfipáticos incluyen, entre otros, copolímero de bloque de polietilenglicol/polipropileno; un polímero antipático que tiene un polímero de acrilamida como cadena principal (estructura principal), un grupo dodecilo como cadena lateral hidrófoba y un grupo de lactosa o un grupo carboxilo como cadena lateral hidrófila; un complejo iónico de una macromolécula aniónica (por ejemplo, heparina, dextranosulfato, ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN etc.), etc.) y una cadena larga de sal de alquilamonio; un polímero antipático que tiene una proteína hidrosoluble (por ejemplo, gelatina, colágeno, albúmina etc.) como grupo hidrófilo; y similares. Los ejemplos de un único polímero biodegradable y antipático incluyen, entre otros, copolímero de bloque de ácido poliláctico/polietilenglicol, copolímero de bloque de poli( $\epsilon$ -caprolactona)/polietilenglicol, copolímero de bloque de poli(ácido málico) / (un éster de alquilo de ácido polimálico) y similares.

Como se usa en el presente documento, la expresión “corazón deteriorado” y “miocardio deteriorado” hace referencia a un corazón y a un miocardio, respectivamente, que tienen un deterioro, incluyendo, entre otros, deterioros isquémicos y similares. Los ejemplos de los deterioros isquémicos incluyen, entre otros, infarto de miocardio, angina de pecho y similares.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión “agente estimulante tridimensional” hace referencia a un agente que estimula la conexión biológica en una tercera dimensión después de preparar un grupo de células. Los ejemplos de dicho agente incluyen de forma representativa agentes capaces de estimular la secreción de una matriz celular. Los ejemplos de un agente estimulante tridimensional incluyen, entre otros, ácido ascórbico o un derivado del mismo (por ejemplo, ácido 2-fosfato-ascórbico, ácido 2-fosfato-ascórbico, L-ascorbato sódico etc.) y similares. 10 Preferentemente, un agente estimulante tridimensional puede ser, preferentemente, un componente de una matriz extracelular de una parte objetivo mediante la aplicación y/o uno o más componentes capaces de estimular la secreción de una matriz extracelular en una cantidad similar. Cuando un agente estimulante tridimensional comprende una pluralidad de componentes, los componentes pueden ser componentes de una matriz extracelular 15 de una parte objetivo mediante la aplicación y/o uno o más componentes capaces de estimular la secreción de una matriz extracelular en una cantidad similar.

Como se usa en el presente documento, la expresión “ácido ascórbico o un derivado del mismo” incluye ácido ascórbico y un análogo del mismo (por ejemplo, ácido 2-fosfato-ascórbico, ácido 1-fosfato-ascórbico, etc.), y una sal del mismo (por ejemplo, sal de sodio, sal de magnesio etc.). 20

#### **(Descripción de las realizaciones preferidas)**

En lo sucesivo en el presente documento, se describirán las realizaciones preferidas de la presente invención. Las siguientes realizaciones se proporcionan para una mejor comprensión de la presente invención y el alcance de la presente invención no debe limitarse a la descripción siguiente. Los expertos en la técnica apreciarán claramente que se pueden realizar variaciones y modificaciones sin desviarse del alcance de la presente invención con referencia a la memoria descriptiva. 25

30 De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona una estructura tridimensional aplicable al corazón, que comprende una célula derivada de una parte distinta a la del miocardio de un adulto. Estructuras tridimensionales convencionales aplicables al corazón comprenden una célula derivada del miocardio de un adulto y tienen un tamaño pequeño y mal rendimiento. La presente invención es la primera en el mundo en proporcionar una estructura tridimensional aplicable al corazón que comprende una célula derivada de una parte distinta al miocardio 35 de un adulto (es decir, no embrión) cultivando la célula de la parte distinta al miocardio de un adulto en condiciones específicas (por ejemplo, en presencia de un agente estimulante tridimensional etc.) La estructura tridimensional comprende una célula preferentemente sustancialmente una célula y un componente derivado de la célula (por ejemplo, una matriz extracelular etc.). Por tanto, en una realización preferida, la estructura tridimensional de la presente invención comprende un material biológico y, por consiguiente, supera de forma ventajosa los inconvenientes debidos a un armazón (por ejemplo, mala biocompatibilidad, inmunogeneidad etc.) en comparación 40 con las estructuras convencionales que tienen un armazón.

Una célula contenida en la estructura tridimensional de la presente invención es una célula madre mesenquimatosas. Aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, la razón de que una célula mesenquimatosas es preferible es que la propia célula mesenquimatosas tiene una excelente compatibilidad con el corazón y puede tener capacidad para diferenciarse en el tejido cardíaco. 45

Los ejemplos de una célula mesenquimatosas incluyen, entre otros, médula ósea, células grasas, células sinoviales y similares. 50

Por tanto, cultivando adecuadamente células derivadas de partes distintas al miocardio análogo se puede reparar un corazón defectuoso sin cirugía de implantación.

55 En una realización preferida, una célula usada en la presente invención es, de forma ventajosa, una célula derivada de un sujeto a la que se aplica una estructura tridimensional. En este caso, una célula usada en el presente documento también se denomina célula autóloga. Usando células autólogas se pueden prevenir o reducir las reacciones inmunológicas de rechazo.

60 En otra realización, una célula usada en la presente invención puede ser una célula no derivada de un sujeto a la que se aplica una estructura tridimensional. En este caso, preferentemente se adopta una medida para prevenir las reacciones inmunológicas de rechazo.

65 En otra realización, una célula usada en la estructura tridimensional de la presente invención contiene sustancialmente nada de marcador cardíaco adulto. En base al hecho de que la célula no contiene sustancialmente marcador cardíaco adulto, es posible confirmar que la estructura tridimensional usa una célula no derivada de corazón adulto. La estructura tridimensional de la presente invención puede evitar el uso del corazón de un adulto

para aumentar significativamente el potencial de las terapias cardíacas.

- 5 El marcador de corazón adulto descrito anteriormente se expresa a menos de un nivel que normalmente posee un corazón adulto o tejido del mismo. Por ejemplo, dicho nivel puede ser inferior a aproximadamente el 100 % del nivel natural de un corazón adulto o un tejido del mismo, preferentemente inferior a aproximadamente el 80 %, más preferentemente inferior a aproximadamente el 50 %, incluso más preferentemente inferior a aproximadamente el 20 %, todavía más preferentemente inferior a aproximadamente el 10 % e incluso todavía más preferentemente inferior a aproximadamente el 5 %.
- 10 En una realización preferida, una célula usada en la estructura tridimensional de la presente invención contiene sustancialmente nada de marcadores de corazón adulto. Confirmando la ausencia de todos los marcadores de corazón adulto, es posible confirmar con más fiabilidad que la estructura no es un corazón adulto. Obsérvese que no todos los marcadores de corazón adulto se comprueban siempre.
- 15 Una célula usada en la estructura tridimensional de la presente invención es una célula madre mesenquimatosa. Las células derivadas de un corazón tienen una fuente de suministro limitada y las células derivadas de un corazón antólogo están sustancialmente no disponibles. Por tanto, es preferible el uso de las células no derivadas de un corazón.
- 20 La estructura tridimensional de la presente invención normalmente es aplicable al corazón y puede aplicarse a otros órganos. Preferentemente, la estructura tridimensional de la presente invención se puede aplicar a un miocardio.
- 25 En una realización, la estructura tridimensional de la presente invención comprende una lámina celular que tiene al menos una capa. En una realización determinada, la estructura tridimensional de la presente invención comprende una lámina celular que tiene solo una capa. Proporcionando una lámina celular, la naturaleza intacta o no porosa de la estructura tridimensional de la presente invención se asegura. Por tanto, la estructura tridimensional de la presente invención que comprende una lámina celular que tiene al menos una capa es útil en aplicaciones en las que está cubierto un lugar dañado.
- 30 En una realización preferida, la estructura tridimensional de la presente invención comprende una lámina celular que tiene una pluralidad de capas. Preferentemente, es ventajoso que una pluralidad de capas en la lámina celular se conecte biológicamente entre sí de forma ventajosa. En este caso, la conexión biológica es, preferentemente, una conexión física a través de una matriz extracelular o una conexión eléctrica (por ejemplo, pulsación etc.). La conexión varía en función del lugar deseado. Cuando se pretende implantar la estructura tridimensional de la
- 35 presente invención en el corazón, la conexión biológica incluye normalmente conexión eléctrica. Como alternativa, la conexión biológica puede ser una conexión sin un armazón.
- 40 La estructura tridimensional de la presente invención puede proporcionarse como agente farmacéutico. Como alternativa, la estructura tridimensional de la presente invención puede ser preparada por un profesional médico o similar en un lugar real. Como alternativa, una vez que un profesional médico prepara las células, una tercera parte puede cultivar las células y preparar una estructura tridimensional que comprenda las células y usarla para cirugía. En este caso, el cultivo celular pueden realizarlo los expertos en la técnica, así como profesionales médicos. Por tanto, los expertos en la técnica pueden determinar las condiciones de cultivo en función del tipo de células y el lugar de implantación objetivo de acuerdo con la divulgación de la presente memoria descriptiva.
- 45 En otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para producir una estructura tridimensional aplicable a un corazón adulto, que comprende una célula madre mesenquimatosa. El método comprende las etapas de: a) cultivar una célula madre mesenquimatosa derivada de una parte distinta al miocardio de un adulto sobre un soporte que comprende una macromolécula respondedora a la temperatura; b) fijar una temperatura de cultivo fuera del intervalo de la temperatura de solución crítica de la macromolécula respondedora a la temperatura (por encima del límite superior, si existe; o por debajo del límite inferior, si existe); y c) desprender la célula cultivada como una estructura tridimensional. La célula derivada de una parte distinta a un miocardio es una célula madre mesenquimatosa. Preferentemente, la temperatura de solución crítica límite superior o inferior con el agua es de 0 °C a 80 °C. Preferentemente, una macromolécula respondedora a la temperatura que tiene la temperatura de
- 50 solución crítica descrita anterior se injerta en el soporte.
- 55 En una realización preferida de la presente invención, en el método para producir una estructura tridimensional es preferible que la estructura no se trate con una enzima de degradación de proteínas en o antes de la etapa de desprendimiento. En métodos convencionales para preparar láminas celulares o similares, se realiza un tratamiento usando una enzima de degradación de proteínas para facilitar el desprendimiento. No obstante, en este caso, la lámina celular se daña y, por tanto, no se puede usar como una estructura tridimensional. En el método de la presente invención, el tratamiento usando una enzima de degradación de proteínas se puede omitir, de modo que se puede conseguir una estructura tridimensional intacta.
- 60 En una realización preferida, la macromolécula respondedora a la temperatura es poli(N-isopropilacrilamida). La poli(N-isopropilacrilamida) tiene una temperatura de solución crítica en el límite inferior de un poco más de 20 °C.
- 65

Por tanto, en este caso, cambiando el medio de cultivo desde una temperatura de cultivo típica (por ejemplo, de aproximadamente 37 °C) a aproximadamente 20 °C, es posible preparar fácilmente una estructura tridimensional. De este modo se puede proporcionar una estructura tridimensional aplicable a la cirugía de implantación, que comprende una célula no derivada del miocardio de un adulto. Como resultado se puede proporcionar una técnica sustancialmente distinta al trasplante de órgano a una serie de enfermedades que se pueden tratar únicamente mediante trasplante de corazón convencional (por ejemplo, miocardiopatía dilatada etc.). Es decir, mediante la presente invención se puede proporcionar una terapia que no se puede conseguir mediante técnicas convencionales.

En una realización más preferida, la estructura tridimensional de la presente invención comprende, preferentemente, una agente estimulante de organización tridimensional cuando se realiza cultivo celular. Dicho agente estimulante de organización tridimensional puede ser ácido ascórbico o un derivado del mismo.

En otro aspecto, el tejido protésico y la estructura tridimensional de la presente invención carece de lesiones causadas por una enzima de degradación de proteínas, tales como, representativamente, dispa, tripsina, o similares durante el cultivo. Por tanto, el tejido protésico y la estructura tridimensional que se desprende del material de base, se pueden recuperar como una masa celular que sujeta proteínas entre las células (por ejemplo, una matriz extracelular) y que tiene un determinado nivel de resistencia. El tejido protésico y la estructura tridimensional también conservan las funciones intactas, tales como la función de contracción/relajación, conexión eléctrica intracelular, alineación y similares, que son específicas de los cardiomiocitos. Además, la estructura tridimensional puede tener varias alineaciones celulares de tipo tejido biológico características (por ejemplo, formación de una membrana que consiste en tejido conjunto, formación de una luz que consiste en células endoteliales de los vasos sanguíneos etc.). Cuando se usan enzimas de degradación de proteínas típicas (por ejemplo, tripsina etc.) para desprender la estructura tridimensional o tejido protésico no se conservan sustancialmente estructuras de desmosoma entre las células, proteínas de tipo membrana basal entre las células y materiales base o similares, de modo que las células están separadas individualmente. Entre estas enzimas de degradación de proteínas, la dispa destruye las proteínas de tipo membrana basal entre las células y los materiales base sustancialmente completamente, pero no necesariamente estructura de desmosoma. La estructura de desmosoma se puede retener si la temperatura es de 10 °C a 60 °C. No obstante, en este caso, la estructura tridimensional o tejido protésico resultante tiene una resistencia débil. Por el contrario, la estructura tridimensional o tejido protésico de la presente invención puede retener el 80 % o más de cada uno de la estructura de desmosoma y la proteína de tipo membrana basal, lo que tiene como resultado los varios efectos descritos anteriormente. En el soporte de cultivo celular, un polímero respondedor a la temperatura para usar en el recubrimiento del material base tiene una temperatura de solución crítica límite superior o inferior de 0 °C to 80 °C en solución acuosa y, preferentemente, de 20 °C a 50 °C. Si la temperatura de solución crítica límite superior o inferior supera los 80 °C, es probable que las células sean destruidas. Si la temperatura de solución crítica límite superior o inferior es inferior a 0 °C, la tasa de crecimiento tisular es extremadamente baja o las células son destruidas.

El polímero respondedor a la temperatura usado en la presente invención pueden ser un homopolímero o un copolímero. Un ejemplo de dicho polímero es un polímero descrito en, por ejemplo, la publicación japonesa abierta a consulta por el público n° 2-211865, además de los descritos anteriormente. Específicamente, por ejemplo, dicho polímero respondedor a la temperatura se obtiene mediante homo o copolimerización de los monómeros siguientes. Los ejemplos de monómeros utilizables incluyen, entre otros, compuestos de (met)acrilamida, derivados de met(acrilamida) N-(o N,N-di)alquil sustituidos o derivados de éter de vinilo. En el caso de los copolímeros se puede usar dos cualesquiera o más de estos monómeros. Adicionalmente, se pueden usar copolímeros que comprenden monómeros distintos a los monómeros descritos anteriormente, copolímeros obtenidos mediante injerto o copolimerización de polímeros o una mezcla de homopolímeros o copolímeros. Adicionalmente, los polímeros se pueden reticular en una medida tal que no afectan a las propiedades inherentes del polímero. Los ejemplos del material base a recubrir incluyen, entre otros, materiales normalmente usados en cultivo celular (por ejemplo, vidrio, vidrio modificado, poliestireno, polimetilmetacrilato etc.), sustancialmente todos los materiales capaces de conformarse generalmente (por ejemplo, compuestos macromoleculares además de los descritos anteriormente, cerámicas etc.).

Un método para recubrir un soporte con un polímero respondedor a la temperatura no está particularmente limitado y se puede realizar de acuerdo con, por ejemplo, la publicación japonesa abierta a consulta por el público n° 2-211865. Específicamente, el recubrimiento se puede realizar sometiendo un material base y el monómero o polímero descrito anteriormente a irradiación de haz de electrones (EB), irradiación de rayos  $\gamma$ , irradiación ultravioleta, tratamiento con plasma, irradiación con corona o reacción de polimerización orgánica o adsorción física o similares (por ejemplo, aplicación, cruzamiento etc.).

En la presente invención, el cultivo celular se realiza sobre el soporte de cultivo celular descrito anteriormente (por ejemplo, una placa de cultivo celular etc.). Cuando el polímero descrito anteriormente que cubre la superficie del material base tiene una temperatura de solución crítica límite superior, la temperatura del medio se fija para que sea igual o inferior a la temperatura de solución crítica límite superior. Cuando el polímero descrito anteriormente que cubre la superficie del material base tiene una temperatura de solución crítica límite inferior, la temperatura del medio se fija para que sea igual o superior a la temperatura de solución crítica límite inferior. No obstante, un

intervalo de temperatura baja de forma que las células cultivadas no puedan crecer y un intervalo de temperatura alta de forma que las células cultivadas sean destruidas es inadecuado. Las condiciones de cultivo distintas a la temperatura pueden ser aquellas bien conocidas en la técnica y no están particularmente limitadas. Por ejemplo, el medio se puede suplementar con suero bovino fetal (FCS) conocido o similares o, como alternativa, se puede emplear medio sin suero sin suplemento de dicho suero.

En el método de la presente invención, el periodo de tiempo requerido para cultivo puede determinarse en función de la aplicación del tejido protésico o estructura tridimensional. Con el fin de desprender y recuperar el tejido protésico o estructura tridimensional cultivado del material de soporte, la temperatura del material de soporte que tiene células fijadas se incrementa a o por encima de la temperatura de solución crítica límite superior de un polímero que cubre el material base de soporte o se disminuye a o por debajo de la temperatura de solución crítica límite inferior. En este caso, el tejido protésico o la estructura tridimensional que se cultiva se desprenden directamente u, opcionalmente, con una membrana macromolecular unida. Obsérvese que el tejido protésico o estructura tridimensional se puede desprender en el medio de cultivo donde las células se han cultivado o, como alternativa, en otras soluciones isotónicas. Dichas soluciones se pueden seleccionar en función de la finalidad. Los ejemplos de la membrana macromolecular, que opcionalmente está fijada a la lámina celular o estructura tridimensional, incluyen, entre otros, difluoruro de polivinilideno (PVDF) hidrofiliado, polipropileno, polietileno, celulosa y derivados de los mismos, quitina, quitosano, colágeno, papel (por ejemplo, papel de Japón etc.), uretano, materiales macromoleculares de tipo red o de tipo punto de espiga (por ejemplo, licra, etc.) y similares. Cuando se usa un material macromolecular de tipo red o de tipo punto de espiga, el tejido protésico o estructura tridimensional tiene un grado más alto de libertad, de forma que se puede incrementar la función de contracción/relajación del mismo. Un método para producir el tejido protésico o estructura tridimensional que comprende células de la presente invención no está particularmente limitado. Por ejemplo, el tejido protésico o estructura tridimensional de la presente invención se puede producir usando la lámina celular cultivada descrita anteriormente fijada a una membrana macromolecular.

Con el fin de desprender y recuperar el tejido protésico o estructura tridimensional con un rendimiento alto del soporte del cultivo celular, se da golpecitos o se agita el soporte del cultivo celular o el medio se agita con una pipeta. Estos procedimientos se pueden realizar de forma individual o en combinación. Además, el tejido protésico o estructura tridimensional puede aclararse opcionalmente con solución isotónica o similar antes del desprendimiento y la recuperación. Estirando el tejido protésico o estructura tridimensional en una dirección específica después de desprenderse del material base, la lámina celular o estructura tridimensional se proporciona con alineación. El estirado se puede realizar usando un dispositivo de tracción (por ejemplo, Tensilon, etc.), o simplemente unas pinzas o similares. Un método de estiramiento no está particularmente limitado. Proporcionando alineación, es posible conferir direccionalidad al movimiento de la propia lámina celular o estructura tridimensional. Por tanto, por ejemplo, es posible permitir que el tejido protésico o estructura tridimensional se mueva de acuerdo con el movimiento de un órgano específico. El tejido protésico o estructura tridimensional se puede aplicar eficientemente a los órganos.

El tejido protésico o la estructura tridimensional que se obtiene de este modo no se puede obtener mediante técnicas convencionales. El tejido protésico o la estructura tridimensional retienen la membrana basal que se rompe en las técnicas convencionales. Por tanto, el tejido protésico o estructura tridimensional se puede aceptar de forma satisfactoria por el tejido circundante y puede pulsar *in situ* cuando se entierra en cualquier parte de un organismo (por ejemplo, corazón, hueso, músculo, brazo, hombro, pie y otros órganos). Aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que la razón es la siguiente. El tejido protésico o la estructura tridimensional enterrada dentro de un organismo es aceptada por un tejido biológico y se contrae o relaja. En este caso, el tejido protésico o la estructura tridimensional está en el estado de oxígeno bajo. Para compensar el estado, las células endoteliales de los vasos sanguíneos entran de forma agresiva en el tejido protésico o estructura tridimensional desde el tejido biológico circundante. Como resultado se forman vasos sanguíneos de modo que se pueda suministrar suficiente oxígeno y nutrientes a través de la sangre. Por tanto, el tejido protésico o estructura tridimensional enterrada dentro de un organismo puede formar un tejido funcional dentro del organismo. Cabe esperar firmemente que dicho tejido protésico o estructura tridimensional se use en aplicaciones clínicas, tal como implantación y similar. Específicamente, el tejido protésico o estructura tridimensional de la presente invención se puede usar como instrumento terapéutico para cardiopatías (por ejemplo, infarto de miocardio etc.). En este caso, por ejemplo, el tejido protésico o estructura tridimensional se implanta en un sitio de un corazón que tiene una débil fuerza de contracción. Como alternativa, el tejido protésico o estructura tridimensional se puede aplicar alrededor de un vaso sanguíneo para mejorar la circulación. Por ejemplo, el tejido protésico o estructura tridimensional es útil como instrumento terapéutico para la enfermedad de Raynaud grave, un hombro rígido grave, la disfunción de la aorta y similares. Obsérvese que se puede usar repetidamente un soporte de cultivo celular para su uso en la presente invención.

(Preparación de tejido protésico usando agente estimulante tridimensional)

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para producir un tejido protésico. El método para producir un tejido protésico comprende las etapas de: A) proporcionar una célula; B) introducir la célula en un recipiente que contiene un medio de cultivo celular que incluye un agente estimulante tridimensional, donde el recipiente tiene una base con un área suficiente para acomodar un tamaño deseado del tejido protésico; y C) cultivar

la célula en el recipiente durante un periodo de tiempo suficiente para formar el tejido protésico que tiene el tamaño deseado.

5 La célula descrita anteriormente puede ser cualquier célula. Un método para proporcionar una célula es bien conocido en la técnica. Por ejemplo, se extrae un tejido y las células se aíslan del tejido. Como alternativa, las células se aíslan del fluido corporal que contiene células sanguíneas o similares. Como alternativa se prepara una línea celular en un cultivo artificial. La presente invención no está limitada a esto.

10 El método para producir un tejido protésico de la presente invención usa un medio de cultivo celular que contiene un agente estimulante tridimensional. Los ejemplos de dicho agente estimulante tridimensional incluyen, entre otros, ácido ascórbico o un derivado del mismo, ácido 1-fosfato-ascórbico, ácido 2-fosfato-ascórbico, ácido L-ascórbico y similares.

15 El medio de cultivo celular usado en la presente invención puede ser cualquier medio que permita el crecimiento de una célula de interés. Los ejemplos de dicho medio incluyen, entre otros, DMEM, MEM, F12, DME, RPMI1640, MCDB104, 199, MCDB153, L15, SkBM, medio basal y similares que se suplementan con glucosa, FCS (suero bovino fetal), antibióticos (penicilina, estreptomycin, etc.) según sea adecuado.

20 El recipiente usado en la presente invención puede ser cualquier recipiente normalmente usado en la técnica que tenga una base con un área suficiente para acomodar un tamaño deseado del tejido protésico. Los ejemplos de dicho recipiente incluyen, entre otros, placas petri, matraces, recipientes de molde y similares, y, preferentemente, recipientes que tienen un área grande de la base (por ejemplo, al menos 1 cm<sup>2</sup>). El material del recipiente puede ser cualquier material e incluyen, entre otros, vidrio, plástico (por ejemplo, poliestireno, policarbonato etc.), silicona y similares.

25 En una realización preferida, el agente estimulante tridimensional usado en el método para producir un tejido protésico de la presente invención incluye ácido 2-fosfato ascórbico. Convencionalmente, se sabe que el ácido ascórbico se usa para cultivo celular. No obstante, no se produjeron informes de que el ácido 2-fosfato-ascórbico se use intencionadamente para la formación de tejido. En la presente invención, añadiendo una determinada cantidad de ácido 2-fosfato-ascórbico, es posible prevenir que una matriz extracelular se produzca en una cantidad excesivamente grande, la composición tiene un nivel implantable de matrices extracelulares y, por tanto, la proparte entre la célula y la matriz extracelular tiene como resultado un nivel implantable de resistencia y similares. Estos efectos son inesperados.

30 En una realización preferida, el ácido 2-fosfato-ascórbico usado en la presente invención normalmente tiene una concentración de al menos 0,01 mM, preferentemente al menos 0,05 mM, más preferentemente al menos 0,1 mM, incluso más preferentemente al menos 0,2 mM, todavía más preferentemente al menos 0,5 mM, e incluso todavía más preferentemente 1,0 mM.

40 Como alternativa, el ácido 2-fosfato-ascórbico usado en la presente invención se puede usar junto con ácido 1-fosfato-ascórbico. En este caso, preferentemente se pueden usar ácido 2-fosfato-ascórbico y ácido 1-fosfato-ascórbico a una proparte específica. Dicha proparte preferible está, por ejemplo, en el intervalo de 1:10 a 10:1. Como alternativa, la proparte preferible es tal que la cantidad molar de ácido 1-fosfato-ascórbico es menor que la cantidad molar de ácido 2-fosfato-ascórbico.

45 En otra realización, el agente estimulante tridimensional usado en la presente invención incluye ácido 2-fosfato-ascórbico. No obstante, no se produjeron informes de que el ácido 2-fosfato-ascórbico se use explícitamente para la formación de tejido. En la presente invención, añadiendo una determinada cantidad de ácido 2-fosfato-ascórbico, es posible prevenir que una matriz extracelular se produzca en una cantidad excesivamente grande, la composición tiene un nivel implantable de matrices extracelulares y, por tanto, la proparte entre las células y la matriz extracelular tiene como resultado un nivel implantable de resistencia y similares. Estos efectos son inesperados.

50 En una realización preferida, cuando la cantidad molar de ácido 1-fosfato-ascórbico es menor que la cantidad molar de ácido 2-fosfato-ascórbico, el ácido 2-fosfato-ascórbico usado en la presente invención normalmente está presente a una concentración de al menos 0,01 mM, preferentemente al menos 0,05 mM, más preferentemente al menos 0,1 mM, incluso más preferentemente al menos 0,2 mM, y todavía más preferentemente al menos 0,5 mM, e incluso todavía más preferentemente 1,0 mM.

60 En una realización preferida determinada, el agente estimulante tridimensional de la presente invención incluye ácido 1-fosfato-ascórbico o una sal del mismo, ácido 2-fosfato-ascórbico o una sal del mismo y ácido L-ascórbico o una sal del mismo.

65 El recipiente usado en un método de producción de tejido protésico descrito en el presente documento se recubre, preferentemente, con una macromolécula respondedora a la temperatura. En otra realización preferida, el recipiente se proporciona, preferentemente, con un armazón que tiene una estructura en panel. La presente invención no está limitada a esto. El uso de una estructura en panel se describe en, por ejemplo, Tanaka K. et al, "Atarashii

Baiomedikaru Intafesu [New Biomedical Interface]", Kagaku Kogyo [Chemical Industry], December 2002, 901-906, Kagaku Kogyo Sha.

5 La macromolécula respondedora a la temperatura que se puede usar en el método de producción de tejido protésico de la presente invención incluye poli(N-isopropilacrilamida).

10 En una realización preferida, después de la etapa de cultivo, el método de producción de tejido protésico de la presente invención comprende además, D) desprender el tejido protésico y permitir que el tejido protésico realice autocontracción. El desprendimiento se puede acelerar aplicando un estímulo físico (por ejemplo, aplicando un estímulo físico a una esquina del recipiente etc.). Cuando se usa una macromolécula respondedora a la temperatura, el desprendimiento se puede acelerar cambiando el ambiente a una temperatura superior o inferior a la temperatura de solución crítica de la macromolécula respondedora a la temperatura. La autocontracción tiene lugar de forma natural después del desprendimiento. Mediante autocontracción, la conexión biológica se acelera particularmente en la tercera dimensión (la dirección perpendicular a las direcciones bidimensionales en el caso del tejido sobre una lámina). Por tanto, un tejido protésico de la presente invención puede tener una estructura tridimensional.

20 En un método de producción de tejido protésico de la presente invención, el tiempo suficiente significa, preferentemente, al menos 3 días y puede ser más o menos de 3 días, aunque varía en función de la aplicación de un tejido protésico de interés. Al tercer día de cultivo, es posible preparar un injerto que se puede aplicar al menos al refuerzo de un corazón.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona un tejido protésico funcional. El tejido protésico funcional de la presente invención es, en el presente documento, un tejido protésico implantable. Hasta ahora se han realizado intentos de producir tejidos protésicos mediante cultivo celular. No obstante, no había tejidos protésicos adecuados para implantación en términos de tamaño, resistencia, lesiones físicas cuando se desprenden o similares. La presente invención proporciona un método de cultivo tisular donde las células se cultivan en presencia de un agente estimulante tridimensional como se ha descrito anteriormente, por lo que no existe problema en términos de tamaño, resistencia y similares, y no existen dificultades en desprender tejidos. Un tejido protésico implantable se proporciona únicamente después de conseguir un método de cultivo tisular. Para enfermedades que se tratan convencionalmente únicamente mediante trasplante de órgano (por ejemplo, cardiopatía resistente (miocarditis, miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía hipertrófica de fase dilatada, miocardiopatía dilatada etc.)), se proporciona una terapia alternativa que tiene una versatilidad general, que es de una utilidad inconmensurable.

35 Una "enfermedad" objetivo de la presente invención puede ser cualquier cardiopatía donde se daña el tejido. Los ejemplos de dicha cardiopatía incluyen, entre otros, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, miocardiopatía y similares. Una terapia combinada de la presente invención se puede aplicar a órganos, además del corazón, siempre que esté dirigida a la regeneración de tejidos dañados. En una realización específica, una enfermedad objetivo de un método de la presente invención es insuficiencia cardíaca resistente.

40 La expresión "insuficiencia cardíaca" hace referencia a la incapacidad del corazón para circular la sangre en una cantidad y calidad requeridas a los órganos de todo el cuerpo debido a una alteración del propio corazón, tal como el fallo de las funciones cardíacas, el fallo de las funciones circulatorias, una reducción de la potencia de contracción o similares. La insuficiencia cardíaca es un síntoma terminal de las cardiopatías, tales como infarto de miocardio, miocardiopatía y similares. Insuficiencia cardíaca grave significa que el estado del corazón es grave y también se denomina insuficiencia cardíaca terminal.

50 La expresión "insuficiencia cardíaca resistente" hace referencia a la insuficiencia cardíaca que es resistente a la terapia y es difícil de mejorar mediante terapia médica y terapia farmacológica. La expresión "insuficiencia cardíaca resistente" se denomina sustancialmente sinónimamente insuficiencia cardíaca crónica o insuficiencia cardíaca terminal. La insuficiencia cardíaca resistente no se puede controlar con terapia triple usando un fármaco digitalico típico, diurético, inhibidor de la ECA y similares, o una terapia farmacológica suplementada con un  $\beta$ -bloqueante. Estas terapias requieren una ayuda mecánica para la circulación, tal como BBIA (bombeo con balón intraaórtico), PCPS (soporte cardiopulmonar percutáneo) o similares o, como alternativa, trasplante de corazón. Por tanto, existe una demanda del desarrollo de una simple terapia radical. En particular, el trasplante de corazón tiene un grave problema de falta de donantes. Cuando no se puede usar un trasplante de corazón (por ejemplo, ancianos, pacientes que necesitan diálisis etc.), la insuficiencia cardíaca resistente supone problemas serios. Por tanto, existe una gran demanda de una alternativa a la terapia con trasplante de corazón.

60 La expresión "infarto de miocardio" hace referencia a una enfermedad donde se produce necrosis isquémica en un área de perfusión asociada con una construcción altamente desarrollada u oclusión causada por varias lesiones de la arteria coronaria. La gravedad del infarto de miocardio se divide en clases de varias formas. La clasificación se puede basar en, por ejemplo, el progreso en el tiempo, la morfología (por ejemplo, el intervalo, el sitio, el tamaño de la necrosis o similares en el miocardio), la forma de necrosis de un miocardio, la reconstrucción de un ventrículo después del infarto, la dinámica de la circulación sanguínea (asociada con terapia, pronóstico etc.), la gravedad clínica y similares. El infarto de miocardio que tiene un nivel elevado de gravedad se denomina particularmente

infarto de miocardio grave.

El término “miocardiopatía” es un término genérico para las enfermedades causadas por anomalías orgánicas y funcionales en un miocardio, que se dividen en miocardiopatía secundaria tras una enfermedad básica (por ejemplo, hipertensión, disbolia, isquemia etc.) y miocardiopatía espontánea que se desarrolla in una enfermedad básica aparente. Como cambio patológico se observa hipertrofia miocárdica, formación de tejido fibroso, degeneración o similares.

La expresión “miocardiopatía dilatada” hace referencia a una insuficiencia funcional del ventrículo izquierdo asociada con la deflación del mismo y también se denomina “miocardiopatía congestiva”. La expresión “miocardiopatía dilatada” puede abreviarse a “DCM”. La miocardiopatía dilatada se asocia con fallos de contracción, que conducen a insuficiencia cardíaca crónica. Los ejemplos de una causa de miocardiopatía dilatada incluyen varias cosas, tales como infección viral, mutación génica y similar. En general, la miocardiopatía dilatada no incluye enfermedades miocárdicas específicas (denominadas convencionalmente enfermedades miocárdicas secundarias), tales como miocardiopatía isquémica causada por otra causa no ambigua, enfermedades miocárdicas asociadas con disbolia o similares. No obstante, estas enfermedades miocárdicas específicas también se incluyen dentro del alcance de la presente invención siempre que la presente invención tenga un efecto terapéutico sobre las mismas. La mayoría de los pacientes tienen una reducción de la potencia de contracción en todo el miocardio. También se dice que la anomalía se puede producir en el movimiento de una parte aislada de una pared. Normalmente, la miocardiopatía dilatada tiene síntomas de insuficiencia cardíaca asociada con congestión y, en ocasiones, tiene malestar por el bajo gasto cardíaco. La miocardiopatía dilatada no tiene una causa conocida y es una enfermedad miocárdica idiopática. La patología de la miocardiopatía dilatada incluye principalmente una reducción de la potencia de contracción de un miocardio, que conduce a la dilatación de la cavidad ventricular izquierda. La patología también incluye una reducción en la cantidad de sangre, un incremento de la presión diastólica en el ventrículo izquierdo y similar. La miocardiopatía dilatada tiene un inicio agudo o insidioso e insuficiencia cardíaca resistente en su etapa final. Patológica o histológicamente, difusamente o localmente se observa degeneración, formación de tejido fibroso o atrofia del tejido miocárdico. Los cardiomiocitos residuales a menudo causan hipertrofia. Además de la insuficiencia cardíaca se produce arritmia grave o tromboembolia, lo que tiene como resultado un mal pronóstico. El ecocardiograma es particularmente útil para el diagnóstico de la miocardiopatía dilatada, que demuestra una reducción difusa del movimiento de la pared, el adelgazamiento de una pared ventricular y la dilatación de una cavidad ventricular. Además se pueden realizar angiografía coronaria (lesión arterial coronaria) y biopsia del miocardio para conseguir un diagnóstico más fiable. Por tanto, en la presente invención se puede usar una técnica de ensayo bien conocida en la material, tal como ultrasonografía cardíaca, un método de ensayo con catéter cardíaco, un método de ensayo médico nuclear (gammagrafía miocárdica), biopsia del miocardio o similares, para confirmar una mejora en la miocardiopatía dilatada.

Convencionalmente, para la miocardiopatía dilatada se realizan una terapia farmacológica usando un inhibidor de la ECA, un diurético, un  $\beta$ -bloqueante, un fármaco cardiotónico o similares, guías para regular la ingesta de sal y agua y ejercicio y similares. No obstante, ninguno de ellos cura la propia enfermedad. Para la arritmia se puede administrar un agente antiarrítmico, tal como amiodarona o similar, que, no obstante, es solo un tratamiento sintomático. Para los trombos y los émbolos se usa un anticoagulante, tal como warfarina o similar, que, no obstante, es solo un tratamiento sintomático. Como tratamiento quirúrgico se usa un marcapasos, un desfibrilador enterrado, un dispositivo de circulación asistida (derivación), trasplante de corazón o similares. No obstante, no se puede decir que estos tratamientos distintos al trasplante de corazón erradiquen la enfermedad. En la actualidad, la grave escasez de donantes limita el trasplante de corazón. Una técnica terapéutica de la presente invención es eficaz para la miocardiopatía dilatada y similares y proporciona un efecto terapéutico ventajoso.

La expresión “miocardiopatía hipertrófica” (MCH) hace referencia a un tipo de miocardiopatía cuyo síntoma principal es una reducción del cumplimiento diastólico debido a un aumento de tamaño anormal de un miocardio e hipertrofia del ventrículo izquierdo. La función contráctil del corazón normalmente se conserva. Las tasas de supervivencia a 5 años y a 10 años son, satisfactoriamente, de aproximadamente 90 % y de aproximadamente 80 %, respectivamente. No obstante, se cree que la miocardiopatía hipertrófica es una causa de muerte súbita, que supone un problema clínico. Por tanto, existe una demanda de una terapia radical para la enfermedad. Una técnica terapéutica de la presente invención también es eficaz para la miocardiopatía hipertrófica y proporciona un efecto terapéutico ventajoso.

La expresión “miocardiopatía hipertrófica de fase dilatada” hace referencia a un tipo de miocardiopatía hipertrófica donde se desarrolla formación de tejido fibroso en un miocardio en el curso de la enfermedad, lo que conduce al adelgazamiento de una pared ventricular y una reducción de la potencia de contracción y, como resultado, aumenta de tamaño una cavidad ventricular, de forma que aparece un síntoma de miocardiopatía dilatada. Se dice que la miocardiopatía hipertrófica de fase dilatada tiene un pronóstico muy malo. Existe una serie de casos subclínicos, que suponen un problema clínico. Por tanto, también existe una demanda de una terapia radical para la miocardiopatía hipertrófica de fase dilatada. Una técnica terapéutica de la presente invención es eficaz para la miocardiopatía hipertrófica de fase dilatada y similar y proporciona un efecto terapéutico ventajoso.

Las terapias convencionales y las técnicas diagnósticas para la insuficiencia cardíaca resistente o similar como se ha descrito anteriormente se describen en, por ejemplo, "Junkanki Shikkan Saishin no Tiryo [Latest Therapy for Circulatory Diseases] 2002-2003, Shigetake Sasayama y Yoshio Yazaki editores, Nankodo, 2002, y similares. Como se describe en "Junkanki Shikkan Saishin no Tiryo [Latest Therapy for Circulatory Diseases] 2002-2003, Shigetake Sasayama y Yoshio Yazaki editores, Nankodo, 2002, que se ha publicado muy recientemente, no habrá una terapia radical para la insuficiencia cardíaca resistente. La presente invención es la primera en proporcionar una terapia para las cardiopatías descritas anteriormente, en particular la insuficiencia cardíaca resistente.

Como se usa en el presente documento, el término "profilaxis" o "prevención" en relación con una determinada enfermedad o trastorno hace referencia a un tratamiento que impide que se produzca dicha afección antes de se produzca la afección o hace que se produzca la afección a un nivel reducido o que se retrase.

Como se usa en el presente documento, el término "terapia" en relación con una determinada enfermedad o trastorno significa que cuando se produce dicha afección, se previene el deterioro de dicha enfermedad o trastorno, preferentemente se conserva como tal, más preferentemente se reduce e incluso más preferentemente se extingue. Como se usa en el presente documento, el término "terapia radical" hace referencia a una terapia que erradica la raíz o la causa de un proceso patológico. Por tanto, cuando se elabora una terapia radical para una enfermedad, en principio no hay recurrencia de la enfermedad.

Como se usa en el presente documento, el término "pronóstico" también se denomina "tratamiento pronóstico". El término "pronóstico" en relación con una determinada enfermedad o trastorno hace referencia a un diagnóstico o tratamiento de dicha afección después de una terapia.

En una realización preferida, el tejido protésico de la presente invención tiene una conexión biológica tridimensional. Como se describe en otras partes de la memoria descriptiva, los ejemplos de conexión biológica incluyen, entre otros, la conexión física mediante matrices extracelulares, conexión eléctrica y similar. En la presente invención, la conexión física mediante matrices extracelulares es particularmente importante en vista de la resistencia del tejido.

En una realización, el tejido protésico de la presente invención es diferente de los tejidos protésicos convencionales en cuanto a que el primero comprende una célula.

Preferentemente, un tejido protésico de la presente invención consiste sustancialmente en una célula o un material derivado de la célula. Dado que el tejido protésico está compuesto sustancialmente por solo una célula y un material derivado de célula (por ejemplo, matriz extracelular etc.), el tejido protésico puede tener un mayor nivel de biocompatibilidad y afinidad. El material derivado de célula incluye de forma representativa matrices extracelulares. En particular, el tejido protésico comprende, preferentemente, una célula y una matriz extracelular en una proparte adecuada de los mismos. Dicha proparte adecuada entre una célula y una matriz extracelular es de aproximadamente 1:9 a aproximadamente 9:1, preferentemente de aproximadamente 3:7 a aproximadamente 7:3 y, más preferentemente, de aproximadamente 3:7 a aproximadamente 5:5. Una proparte preferible varía en función de la finalidad. Los expertos en la técnica pueden preparar dichas variaciones. Se puede estimar una proparte adecuada investigando la proparte entre una célula y una matriz extracelular en un órgano de interés.

En otra realización, preferentemente se aísla el tejido protésico de la presente invención. En este caso, el término "aislado" significa que el tejido protésico se separa de un armazón, un soporte y un medio de cultivo usado en el cultivo. Si un tejido protésico de la presente invención carece sustancialmente de materiales, tal como un armazón y similares, es posible suprimir las reacciones adversas tras la implantación, tales como reacciones inmunológicas de rechazo, reacciones de inflamación y similares.

En otra realización, preferentemente el tejido protésico de la presente invención está intacto. Un tejido protésico intacto se puede proporcionar sustancialmente únicamente después del método de producción del tejido protésico de la presente invención usando un agente estimulante tridimensional. Convencionalmente, cuando un tejido protésico se desprende del ambiente de cultivo, necesariamente se aplica un estímulo físico al tejido, de forma que el tejido se daña inevitablemente. Por tanto, se ha realizado un intento de recopilar una pluralidad de láminas celulares preparadas mediante métodos convencionales. No obstante, dicha multicapa de láminas celulares no se puede usar fácilmente para la implantación real. Por tanto, dicho problema se supera mediante la entereza del tejido protésico de la presente invención.

En una realización preferida, el tejido protésico de la presente invención tiene un tamaño grande. La expresión "tamaño grande" en relación con un tejido protésico normalmente significa que el tejido protésico tiene un área suficiente para cubrir un lugar en el cual se implanta el tejido protésico. Dicha área es, por ejemplo, de al menos 1 cm<sup>2</sup>, más preferentemente al menos 2 cm<sup>2</sup>, al menos 3 cm<sup>2</sup>, al menos 4 cm<sup>2</sup>, incluso más preferentemente al menos 5 cm<sup>2</sup> y todavía incluso más preferentemente al menos 6 cm<sup>2</sup>.

En una realización preferida, el tejido protésico de la presente invención es grueso. El término "grueso" en relación con un tejido protésico normalmente significa que el tejido protésico tiene un espesor que proporciona una resistencia suficiente para cubrir un lugar en el cual se implanta el tejido protésico. Dicho espesor es, por ejemplo,

de al menos aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , más preferentemente al menos aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , al menos aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ , al menos aproximadamente 300  $\mu\text{m}$ , incluso más preferentemente al menos aproximadamente 400  $\mu\text{m}$ , todavía más preferentemente al menos aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ , y todavía incluso más preferentemente aproximadamente 1 mm.

5 Un tejido protésico de la presente invención está, preferentemente, no perforado. El tejido protésico no perforado es adecuado para la implantación. El tejido protésico no perforado es particularmente preferible para reforzar un sitio defectuoso de un tejido en forma de bolsa que necesita ser cubierto.

10 En otra realización, el tejido protésico de la presente invención es flexible. Debido a la flexibilidad, el tejido protésico es particularmente adecuado para reforzar órganos móviles. Los ejemplos de órganos móviles incluyen, entre otros, corazones, vasos sanguíneos, músculos y similares.

15 Preferentemente, un tejido protésico de la presente invención tiene una resistencia suficiente para aguantar el movimiento de pulsación de un corazón. La resistencia suficiente para aguantar el movimiento de pulsación es, entre otras, de al menos aproximadamente un 50 % de la resistencia del miocardio de origen natural, preferentemente de al menos aproximadamente un 75 % y más preferentemente de al menos aproximadamente un 100 %.

20 En una realización preferida, el tejido protésico de la presente invención tiene una conexión biológica en las tres dimensiones. Algunos tejidos protésicos se preparan mediante métodos convencionales que tienen conexión biológica en dos dimensiones en cierta medida. No obstante, mediante métodos convencionales no se puede preparar un tejido que tenga conexión biológica en las tres dimensiones. Por tanto, dado que el tejido protésico de la presente invención tiene conexión biológica en las tres dimensiones, el tejido protésico es sustancialmente implantable en cualquier aplicación.

25 Los ejemplos de conexión biológica que es un indicador de un tejido protésico de la presente invención incluyen, entre otros, interconexión de matrices extracelulares, conexión eléctrica, la presencia de transducción de señal intracelular y similar. La interacción de matrices extracelulares se puede observar con un microscopio mediante tinción de la adhesión intracelular según sea adecuado. La conexión eléctrica se puede observar midiendo el potencial eléctrico.

30 En una realización preferida, el tejido protésico de la presente invención tiene una resistencia tisular suficiente para aplicaciones clínicas. La resistencia tisular suficiente para aplicaciones clínicas varía en función de un lugar donde se aplica el tejido protésico. Los expertos en la técnica pueden determinar dicha resistencia con referencia a la divulgación de la memoria descriptiva y técnicas bien conocidas en la materia. Por ejemplo, en una realización preferida, una resistencia requerida por la presente invención es al menos un 80 % de la resistencia tisular de una parte objetivo de una aplicación clínica.

35 En una realización específica, la parte descrita anteriormente objetivo de una aplicación clínica incluye el corazón y, en algunos casos, porciones distintas al corazón.

40 En otro aspecto, la presente invención describe una composición de cultivo celular para producir tejido protésico de una célula. La composición de cultivo celular contiene un ingrediente (por ejemplo, medio disponible comercialmente etc.) para mantener o cultivar la célula y un agente estimulante tridimensional. El agente estimulante tridimensional se ha descrito con detalle en la descripción anterior del método de producción del tejido protésico. Por tanto, el agente estimulante tridimensional incluye ácido ascórbico o un derivado del mismo (por ejemplo, ácido 1-fosfato ascórbico o una sal del mismo, ácido 2-fosfato ascórbico o una sal del mismo, ácido L-ascórbico o una sal del mismo etc.). La composición de cultivo descrita en el presente documento contiene ácido 2-fosfato ascórbico o una sal del mismo a una concentración de al menos 0,1 mM. Como alternativa, en el caso de una composición de cultivo condensada, la composición de cultivo condensada contiene ácido 2-fosfato ascórbico o una sal del mismo a una concentración que se convierte en al menos 0,1 mM tras la preparación. Como alternativa, la concentración límite inferior de ácido 2-fosfato ascórbico o una sal del mismo puede ser 0,01 mM, 0,05 mM, 0,2 mM, o 0,3 mM, incluso más preferentemente 0,5 mM, o, como alternativa, 1,0 mM.

45 En una realización preferida, el agente estimulante tridimensional, contenido en la composición de cultivo celular descrita en el presente documento, incluye ácido 1-fosfato ascórbico o una sal del mismo y ácido 2-fosfato ascórbico o una sal del mismo.

50 El ácido 2-fosfato ascórbico usado en la presente invención se usa de forma concomitante con ácido 1-fosfato ascórbico. En este caso, preferentemente pueden estar presentes ácido 2-fosfato-ascórbico y ácido 1-fosfato-ascórbico a una proparte específica. Dicha proparte preferible está, por ejemplo, en el intervalo de 1:10 a 10:1. Como alternativa, la proparte preferible es tal que la cantidad molar de ácido 1-fosfato-ascórbico es menor que la cantidad molar de ácido 2-fosfato-ascórbico.

60 En otra realización, el agente estimulante tridimensional usado en la presente invención incluye ácido 2-fosfato-ascórbico. No obstante, no se produjeron informes de que el ácido 2-fosfato-ascórbico se use explícitamente para la

formación de tejido. En la presente invención, añadiendo una determinada cantidad de ácido 2-fosfato-ascórbico, es posible prevenir que una matriz extracelular se produzca en una cantidad excesivamente grande, la composición tiene un nivel implantable de matrices extracelulares y, por tanto, la proparte entre la célula y la matriz extracelular tiene como resultado un nivel implantable de resistencia y similares. Estos efectos son inesperados.

5 En una realización preferida, el ácido 2-fosfato-ascórbico usado en la presente invención normalmente está presente a una concentración de al menos 0,01 mM, preferentemente al menos 0,05 mM, más preferentemente al menos 0,1 mM, incluso más preferentemente al menos 0,2 mM, y todavía más preferentemente al menos 0,5 mM, e incluso todavía más preferentemente 1,0 mM.

10 En una realización preferida determinada, el agente estimulante tridimensional incluye ácido 1-fosfato-ascórbico o una sal del mismo, ácido 2-fosfato-ascórbico o una sal del mismo y ácido L-ascórbico o una sal del mismo.

(Tejido protésico para "envolver")

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un tejido protésico para reforzar una parte de un organismo animal. El tejido protésico capaz de dicho refuerzo es una técnica que solo se alcanza después de proporcionar el método de producción de tejido protésico de la presente invención.

20 En una realización preferida, la parte descrita anteriormente incluye órganos con forma de bolsa. Para los órganos con forma de bolsa es importante que el tejido protésico esté intacto y/o no sea poroso. Un tejido protésico que tiene dicha propiedad y un determinado tamaño no se puede proporcionar mediante técnicas convencionales. Por tanto, se puede decir que una terapia sustancial para los órganos con forma de bolsa solo se puede conseguir después de proporcionar el tejido protésico de la presente invención descrito anteriormente. Por tanto, los órganos con forma de

25 bolsa que tienen enfermedades específicas (por ejemplo, enfermedades resistentes (por ejemplo, miocardiopatía dilatada etc.), etc.), primero se puede proporcionar una terapia distinta al trasplante de órgano.

En una realización específica, los ejemplos del órgano con forma de bolsa descrito anteriormente incluyen, entre otros, corazones, hígados, riñones y similares.

30 En una realización específica de la presente invención, el refuerzo descrito anteriormente se puede conseguir disponiendo un tejido protésico de la presente invención para cubrir la parte descrita anteriormente. No es posible usar un tejido protésico proporcionado mediante métodos convencionales para realizar el tratamiento cubriendo la parte descrita anteriormente (es decir, aplicación de "envolver"). Por tanto, el tejido protésico de la presente invención puede proporcionar aplicaciones que no se pueden conseguir mediante técnicas convencionales.

35 Por tanto, en la realización específica descrita anteriormente, el tejido protésico de la presente invención es resistente a la dilatación/contracción de la parte descrita anteriormente.

40 En una realización preferida, el tejido protésico de la presente invención tiene ventajosamente conexión biológica.

En otra realización preferida, la conexión biológica incluye al menos uno de interconexión de matrices extracelulares, conexión eléctrica y transducción de señal intracelular.

45 En otra realización preferida, el tejido protésico para refuerzo de la presente invención se forma cultivando una célula en presencia de un agente estimulante tridimensional.

En otra realización, el tejido protésico para refuerzo de la presente invención comprende una célula (célula autóloga) derivada de un animal que se va a tratar (por ejemplo, un ser humano). Más preferentemente, un tejido protésico para refuerzo de la presente invención comprende únicamente una célula (célula autóloga) derivada de un animal que se va a tratar (por ejemplo, un ser humano).

(Terapia para "envolver")

55 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para reforzar una parte de un organismo animal. El método comprende las etapas de: A) disponer un tejido protésico para cubrir la parte; y B) sujetar el tejido protésico durante un tiempo suficiente para conectar a la parte. La etapa de disponer el tejido protésico para cubrir la parte se puede llevar a cabo usando una técnica bien conocida en la materia. El tiempo suficiente varía en función de una combinación de la parte y el tejido protésico y los expertos en la técnica lo pueden determinar fácilmente según sea

60 adecuado en función de la combinación. Ejemplos de dicho tiempo incluyen, entre otros, 2 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 año y similares. En la presente invención, un tejido protésico comprende, preferentemente, sustancialmente sólo célula(s) y material(es) derivado de la célula. Por tanto, no existe un material concreto que necesite extraerse tras la operación. El límite inferior del tiempo suficiente no es particularmente importante. En este caso, se puede decir que cuanto mayor es el tiempo, más preferible es el tejido protésico. Si el tiempo es suficientemente extremadamente largo, se puede decir que el refuerzo se ha completado sustancialmente.

65 Por tanto, el tiempo no está particularmente limitado.

En otra realización, en un método de refuerzo de la presente invención, la parte descrita anteriormente incluye, preferentemente, órganos con forma de bolsa (por ejemplo, corazones, hígados, riñones etc.). Con el fin de reforzar dicho tejido con forma de bolsa, es necesario envolver el órgano (por ejemplo, cubrir una parte dañada). Primero, la presente invención proporciona un tejido protésico resistente a las aplicaciones de envoltura. Por tanto, el método de refuerzo de la presente invención es ventajoso sobre las técnicas convencionales.

En particular, en el método de refuerzo de la presente invención, un tejido protésico de la presente invención es resistente a la dilatación/contracción de la parte descrita anteriormente. Los ejemplos de dicha dilatación/contracción incluyen, entre otros, el movimiento de pulsación de un corazón, la contracción de un músculo y similares.

En otra realización preferida, en el método de refuerzo de la presente invención, un tejido protésico de la presente invención tiene conexión biológica (por ejemplo, interconexión de matrices extracelulares, conexión eléctrica, transducción de señal intracelular etc.). La conexión biológica se proporciona, preferentemente, en las tres dimensiones.

En otra realización preferida, el método de refuerzo descrito en el presente documento comprende adicionalmente cultivar una célula en presencia de un agente estimulante tridimensional para formar un tejido protésico de la presente invención. Una técnica de implantación/regeneración usando el método que comprende la etapa de cultivar una célula en presencia de un agente estimulante tridimensional no se puede proporcionar mediante técnicas convencionales. El método proporciona una terapia para enfermedades (por ejemplo, cardiopatías resistentes (por ejemplo, miocardiopatía dilatada etc.) etc.), que no se puede conseguir mediante terapias convencionales.

En una realización preferida, en el método de refuerzo de la presente invención, la célula usada en el tejido protésico de la presente invención deriva de un animal donde se va a implantar el tejido protésico (es decir, una célula autóloga). Usando una célula autóloga se pueden evitar los efectos secundarios adversos, tales como reacciones inmunológicas de rechazo o similares.

En otra realización preferida, la parte es un corazón. El corazón tiene una enfermedad o trastorno, tal como insuficiencia cardíaca, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, miocardiopatía, miocarditis, miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía hipertrófica de fase dilatada, miocardiopatía dilatada o similares.

Para algunos órganos se dice que es difícil tratar radicalmente una enfermedad, trastorno o afección específica de los mismos (por ejemplo, cardiopatías resistentes). No obstante, la presente invención proporciona el efecto descrito anteriormente, de modo que hace posible un tratamiento que no se pueda conseguir mediante técnicas convencionales. Se ha aclarado que la presente invención se puede aplicar a terapia radical. Por tanto, la presente invención tiene utilidad que no se puede conseguir mediante medicamentos convencionales.

(Terapia combinada)

En otro aspecto, la presente invención proporciona una terapia de regeneración que usa una citocina, tal como HGF o similar, en combinación con un tejido protésico.

Las citocinas usadas en la presente invención ya están disponibles comercialmente (por ejemplo, HGF-101 de Toyo Boseki, etc.). No obstante, estas citocinas se pueden preparar mediante varios métodos y se pueden usar en la presente invención si se purifican en una medida que se puedan usar como medicamento. El HGF se puede obtener del siguiente modo: se cultivan células cultivadas primarias o una línea celular establecida capaz de producir HGF; y el HGF se separa del sobrenadante del cultivo o similar, seguido de purificación. Como alternativa, un gen que codifica HGF se incorpora en un vector adecuado mediante una técnica de ingeniería genética; el vector se inserta en un huésped adecuado para transformar el huésped; el HGF recombinante de interés se puede obtener del sobrenadante del cultivo del huésped transformado (por ejemplo, Nature, 342, 440(1989); patente japonesa abierta a consulta por el público n° 5-111383; Biochem-Biophys. Res. Commun., 163, 967 (1989), etc.). La célula huésped descrita anteriormente no es particularmente limitada y pueden ser varias células huésped usadas convencionalmente en técnicas de ingeniería genética, incluyendo, por ejemplo, *Escherichia coli*, levaduras, células animales y similares. El HGF obtenido de este modo puede tener una o más sustituciones, deleciones y/o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos, siempre que tenga sustancialmente la misma acción que el HGF de origen natural. Los ejemplos de un método para introducir HGF en los pacientes en la presente invención incluyen, entre otros, un método de liposoma del virus Sendai (HVJ) con una seguridad y eficiencia elevadas (Molecular Medicine, 30, 1440-1448 (1993); Jikken Igaku (Experimental Medicine), 12, 1822-1826 (1994)), y un método de introducción génica eléctrica, un método de introducción génica con escopeta y similar. Preferentemente se usa el método del liposoma de HVJ.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá a modo de ejemplos. Los ejemplos descritos más adelante se proporcionan únicamente con fines ilustrativos. De acuerdo con lo anterior, el alcance de la presente invención no está limitado, a excepción de por las reivindicaciones adjuntas.

## Ejemplos

En los ejemplos siguientes, se trató a los animales de acuerdo con normas definidas por la Universidad de Osaka (Japón) y conforme al espíritu de la protección animal.

5 (Ejemplo 1 (Referencia): Producción y utilización de tejido protésico y estructura tridimensional formados por lámina de cardiomiocitos, la lámina de cardiomiocitos contráctiles de tejido modificado regenera el miocardio deteriorado)

(La lámina de cardiomiocitos contráctiles modificada biológicamente regenera el miocardio infartado)

10 En el ejemplo 1, los presentes inventores investigaron (1) si una lámina de cardiomiocitos (tejido protésico) sobrevive o no tras la implantación y muestra conexión eléctrica histológica con miocardio deteriorado; (2) si la lámina de cardiomiocitos implantada (tejido protésico) puede inducir o no una mejora en una función cardíaca. Como resultado, se determinó que la presente invención proporciona la conexión eléctrica y la mejora de la función cardíaca.

15 Los presentes inventores introdujeron el concepto de la implantación de tejido modificado biológicamente en el tratamiento del miocardio deteriorado. Se demostró que una lámina de cardiomiocitos contráctiles con ingeniería tisular sin un armazón proporciona conexión eléctrica histológica con miocardio deteriorado y regeneración de un miocardio infartado.

20 (Materiales y métodos)

(Modelo de infarto de miocardio)

25 En este estudio se usaron 30 ratas Lewis macho (300 g, 8 semanas de edad, Seac Yoshitomi Ltd, Fukuoka, Japón). El cuidado de animales por seres humanos cumplía los "Principles of Laboratory Animal Care" preparados por la National Society for Medical Research y "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (publicación del NIH N° 86-23, 1985, revisado) preparado por el Institute of Laboratory Animal Resource and publicado por el National Institute of Health. Se indujo infarto agudo de miocardio como se describe en Weisman H.F., Bush D.E., Mannisi J. A., et al., Cellular Mechanism of Myocardial Infarct Expansion, Circulation, 1988; 78: 186-201. En resumen, se anestesió a las ratas con pentobarbital sódico, seguido de ventilación con presión positiva mediante un tubo endotraqueal. Se usó una toracotomía en el 4° espacio intercostal izquierdo y la arteria coronaria descendente anterior izquierda (ADI) se ligó completamente con un hilo de polipropileno 8-0 a una distancia de 3 mm desde la raíz de la ADI.

35 (Preparación de placas de cultivo celular con poliestireno injertado con PIPAAm diseñado en rectángulo)

Se preparó un aplaca de cultivo celular injertada con PIPAAm diseñada con forma de rectángulo con un procedimiento específico como se describe en, por ejemplo, Okano T., Yamada N., Sakai H., Sakurai Y., J. Biomed. Mater. Res., 1993; 27:1243-1251. En resumen, una solución monomérica de IPAAm en 2-propanol (amablemente proporcionado por Kohjin, Tokio, Japón) se extendió sobre placas de poliestireno con cultivo tisular (TCPS) (Falcon 3002, Becton Dickinson). Después, estas placas se sometieron a irradiación (dosis del haz de electrones: 0,25 MGy) usando un sistema de procesamiento con haz de electrones de área (Nisshin High Voltage), que tiene como resultado la polimerización del IPAAm y la unión covalente de IPAAm a la superficie de la placa. Las placas injertadas con PIPAAm se aclararon con agua destilada fría para eliminar el IPAAm no injertado, seguido de secado de las placas con gas nitrógeno. En la segunda etapa, la superficie injertada con PIPAAm se enmascaró con una cobertura rectangular de vidrio (24x24 mm, Matsunami, Tokio, Japón). Se extendió una solución de monómero de acrilamida (AAm) de 2-propanol sobre la superficie de la placa enmascarada. Después, la superficie de la placa se irradió con un haz de electrones y se lavó. Como resultado, la región rectangular en el centro de cada placa se injertó con PIPAAm (respondedor a la temperatura), mientras que el borde circundante se injertó con polo-AAm (adhesivo no celular). La placa injertada con PIPAAm diseñada en rectángulo se esterilizó con gas de óxido de etileno antes de usar en cultivo.

(Cultivo primario de células de músculo ventricular de rata recién nacida)

55 Se prepararon cardiomiocitos primarios de rata recién nacida de acuerdo con un procedimiento descrito anteriormente en, por ejemplo, Shimizu T., Yamato M., Akutsu T. et al., Circ. Res., Feb 22, 2002; 90(3):e40. En resumen, se sacrificó a las ratas recién nacidas de 1 a 2 días de edad con anestesia profunda y rápidamente se extrajeron los corazones, seguido de la digestión con solución de Hank con colagenasa (clase II, Worthington Biochemical) a 37 °C. Las células aisladas se suspendieron en medio de cultivo que contiene 6 % de FCS, 40 % de medio 199 (Gibco BRL), 0,2 % de solución de penicilina-estreptomina, 2,7 mmol/l de glucosa y 54 % de solución salina equilibrada (116 mmol/l de NaCl, 1,0 mmol/l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,8 mmol/l de MgSO<sub>4</sub>, 1,18 mmol/l de KCl, 0,87 mmol/l de CaCl<sub>2</sub> y 26,2 mmol/l de NaHCO<sub>3</sub>). La suspensión celular se sembró a una densidad de  $8 \times 10^6$  células/placa, seguido de incubación en una atmósfera humidificada que contiene 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

65

(Cultivo primario de fibroblastos)

Se prepararon fibroblastos primarios de acuerdo con un procedimiento publicado previamente en, por ejemplo, Yablonka-Reuveni Z., Nameroff M., Skeletal Muscle Cell Populations Separation and Partial Characterization of Fibroblast-Like Cells from Embryonic Tissue Using Density Centrifugation, Histochemistry, 1987; 87:27-38. En resumen, una suspensión de células derivadas del músculo de la para de ratas Lewis de 8 semanas de edad se separó en fibroblastos y células musculares mediante centrifugación por gradiente de densidad en Percoll™ (Amersham Biosciences Sweden). Los fibroblastos aislados se usaron para una lámina de fibroblastos control.

10 (Producción de una lámina de cardiomiocitos)

Los cardiomiocitos aislados de la rata recién nacida se cultivaron sobre placa de cultivo celular de poliestireno injertada con PIPAAm diseñada como rectángulo. Disminuyendo la temperatura a 20 °C, las células se desprendieron como una lámina celular rectangular. Se apilaron dos láminas de cardiomiocitos para producir un injerto de corazón más grueso. La observación transversal de la lámina cardiaca de doble capa demostró una íntima conexión y tejido homogéneo de tipo corazón. El movimiento simultáneo de una lámina de cardiomiocitos de cuatro capas se detectó a simple vista (datos no mostrados). En el caso de la lámina de fibroblastos, los fibroblastos aislados se cultivaron en la misma placa durante 2 días y se desprendieron como una lámina celular rectangular mediante el mismo método.

20 (Implantación de una lámina de cardiomiocitos)

La lámina de cardiomiocitos se implantó en ratas de Lewis 2 semanas después de la unión de la ADI. Específicamente se realizó una toracotomía en el 4º espacio intercostal izquierdo en la rata con anestesia general. La región del infarto se identificó visualmente en base a la cicatriz de la superficie y el movimiento anormal de la pared. La lámina de cardiomiocitos o la lámina de fibroblastos se implantaron en un miocardio infartado. No se trató a un grupo control.

30 La función cardíaca se evaluó 2 semanas, 4 semanas y 8 semanas después de la implantación. 8 semanas después de la implantación se extrajo el corazón y se seccionó y se procesó para pruebas histológicas e inmunohistológicas.

35 Con el fin de identificar la lámina de cardiomiocitos implantada, se aislaron cardiomiocitos de rata recién nacida EGFP con el mismo protocolo y se preparó una lámina de d. Los presentes inventores implantaron la lámina de cardiomiocitos de rata recién nacida EGFP en un miocardio infartado de ratas atómicas. Los presentes inventores pudieron detectar cardiomiocitos positivos EGFP en el e miocardio infartado (Figura 6, parte inferior izquierda y parte inferior derecha).

(Medición de la función cardíaca del corazón de rata)

40 Se anestesió a las ratas con pentobarbital sódico. La anestesia se suplemento con etanol para mantener una anestesia ligera. Las ratas se aseguraron ligeramente en una posición supina y se afeitaron los precordios de las ratas. Se realizó una ultrasonografía del corazón usando un ecocardiógrafo disponible comercialmente SONOS 5500 (PHILIPS Medical Systems, EE.UU.). Se colocó un transductor de matriz anular de 12 MHz en una capa de gel acoplador acústico aplicada sobre el hemitórax izquierdo. Se hizo que el transductor se pusiera cuidadosamente en contacto adecuado con el tórax al tiempo que se evita un nivel excesivo de presión en el tórax. Se realizaron imágenes de las ratas en posición de decúbito lateral izquierdo. Primero se obtuvieron imágenes del corazón en un modo bidimensional en una sección transversal del eje corto a un nivel del diámetro mayor del ventrículo izquierdo (VI). El área del ventrículo izquierdo (VI) sistólico y el área del ventrículo izquierdo (VI) diastólica se determinaron al mismo tiempo. El volumen del ventrículo izquierdo (VI) se estimó en base al área del eje corto del ventrículo izquierdo (VI) Gorcsan J. 3rd, Morita S., Mandarino W.A., Deneault L.G., Kawai A., Kormos R.L., Griffith B.P., Pinsky M. R., Two-dimensional Echocardiographic Automated Border Detection Accurately Reflects Changes in Left ventricular Volume, J. Am. Soc. Echocardiogr., 1993; 6: 482-9). La imagen resultante se usó para localizar un cursor en modo M perpendicular a la pared anterior del ventrículo izquierdo (VI) y la pared posterior del ventrículo izquierdo (VI). Todas las mediciones se realizan on line usando un monitor. Las mediciones diastólicas se realizaron en el momento de una dimensión diastólica máxima del ventrículo izquierdo (VI) máxima aparente. Una dimensión telesistólica del ventrículo izquierdo (VI) se midió en el momento de la desviación sistólica más anterior de la posterior del ventrículo izquierdo (VI). Se midieron la dimensión del ventrículo izquierdo (VI) en la diástole (LVDd) y la dimensión del ventrículo izquierdo (VI) del ventrículo izquierdo (VI) en la sístole. Los datos de dimensión y los datos del área se representaron mediante promedio de los valores medidos de dos o tres latidos seleccionados. Una fracción de eyección (FE) del ventrículo izquierdo (VI) se calculó mediante:

$$\text{LVEF (\%)} = [ (\text{LVDd}^3 - \text{LVDs}^3) / \text{LVDd}^3 ] \times 100$$

El acortamiento fraccional (FS) del VI % se calculó mediante:

$$\text{LV \%FS} = [ (\text{LVDd} - \text{LVDs}) / \text{LVDd} ] \times 100$$

(Cuantificación mediante endocardiografía del movimiento de la pared del ventrículo izquierdo regional usando cinesia)

La cinesia en color es una extensión de esta tecnología, que compara los valores de retrodispersión tisular entre sucesivos marcos acústicos como medio para rastrear automáticamente y mostrar el movimiento del endocardio en tiempo real. La cinesia en color se incorporó en un sistema de ultrasonidos disponible comercialmente (SONOS 5500, PHILIPS Medical Systems, EE.UU.) (Auchincloss 1988, Transplantation 46:1; Robert M. L., Philippe V., Lynn W., James B., Claudia K., Joanne S., Rick K., David P., Victor M. A., et al., "Echocardiographic quantification of regional left ventricular wall motion with color kinesis", Circulation, 1996, 93:1877-1885).

En todos los sujetos del estudio se realizaron ecografías con un transductor de la matriz anular de 12-MHz. El eje corto paraesternal mediopapilar se obtuvo durante y después de espirar en la posición de decúbito lateral. Después de optimizar la calidad de las imágenes, se activó el sistema de cuantificación acústica para la detección de los límites endocárdicos. El control de la ganancia (ganancia total y lateral, concentración de la ganancia con el tiempo) se ajustó para optimizar el rastreo de la interfaz sangre-endocardio en una región predefinida de interés. Después, la cinesia en color se activó para la codificación por colores in line de desviaciones endocárdicas durante la sístole. Las secuencias de las imágenes que contenían datos de cinesia en color se obtuvieron a través del círculo cardíaco y se almacenan en un formato digital de discos ópticos para el análisis-OFF-LINE.

(Histopatología)

Se obtuvieron muestras del miocardio del ventrículo izquierdo a las 2 y 8 semanas de la implantación de la lámina de cardiomiocitos. Cada muestra se introdujo en formaldehído neutro al 10 % y se incluyó en parafina. De cada muestra se contaron unas pocas secciones en serie y se tiñeron con hematoxilina y eosina para su inspección al microscopio óptico.

Para marcar las células endoteliales vasculares se realizó una tinción inmunohistoquímica del antígeno relacionado con el factor VIII. Las secciones congeladas se fijaron con solución de paraformaldehído al 2 % en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente, se sumergieron en metanol con peróxido de hidrógeno al 3 % durante 15 minutos, después se lavaron con PBS. Las muestras se cubrieron con una solución de seroalbúmina bovina (DAKO LSAB Kit DAKO CORPORATION, Dinamarca) durante 10 minutos para bloquear las reacciones inespecíficas. Las muestras se incubaron durante la noche con el anticuerpo conjugado con EPOS contra el antígeno relacionado con el factor VIII acoplado con HRP (DAKO EPOS factor de Von Wille Brand antihumano/HRP, DAKO Dinamarca), Después de lavar las muestras con PES, se sumergieron en una solución de diaminobencidina (0,3 mg/ml de diaminobencidina en PBS) para obtener una tinción positiva.

Para detectar conexina 43, se realizó la tinción inmunohistoquímica del antígeno relacionado con la conexina 43. Las secciones congeladas se sumergieron en metanol con peróxido de hidrógeno al 3 % durante 5 minutos y después se lavaron con PBS. Las muestras se incubaron durante 20 minutos con un anticuerpo monoclonal de ratón frente a conexina 43 (CHEMICON International, Inc. EE.UU.). Después de lavar las muestras con PBS, se sumergieron en inmunoglobulinas antiratón biotiniladas (DAKO Dinamarca) durante 10 minutos y después se lavaron con PBS. Las muestras se sumergieron en estreptavidina conjugada con peroxidasa (DAKO Dinamarca) durante 10 minutos. Después de lavar las muestras con PBS, se sumergieron en una solución de diaminobencidina (0,3 mg/ml de diaminobencidina en PBS) para obtener una tinción positiva.

(Análisis electrofisiológico)

Un microelectrodo (de 100  $\mu$ m de diámetro, Unique Medical Co., Ltd., Tokio) para capturar los potenciales eléctricos se colocó sobre una cicatriz donde se han implantado láminas de cardiomiocitos, una cicatriz donde se han implantado láminas de fibroblastos o una cicatriz sin tratamiento. Los otros dos electrodos se colocaron sobre la región subcostal izquierda y femoral derecha. Para la estimulación del miocardio del huésped se colocaron dos microelectrodos sobre una aurícula. Para la detección del electrocardiograma del huésped se fijaron tres electrodos sobre las regiones de la mama superior derecha, subcostal izquierda y femoral derecha. Ambos electrogramas se amplificaron mediante amplificadores bioeléctricos (UA-102, Unique Medical Co., Ltd., Tokio) y se registraron mediante un sistema de adquisición de datos (UAS-108S, Unique Medical Co., Ltd., Tokio). La aurícula se estimuló al ritmo de 300 lpm mediante un estimulador (NIHON KODEN Japón). Después se capturó el potencial eléctrico en las regiones de interés.

A continuación, con el fin de analizar el umbral, se colocaron dos microelectrodos para estimulación sobre la cicatriz sin tratamiento, la cicatriz donde se ha implantado la lámina de cardiomiocitos o la cicatriz donde se ha implantado la lámina de fibroblastos. Para la detección de un electrocardiograma del huésped al ritmo, se fijó un electrodo sobre un miocardio normal y los otros dos electrodos se colocaron en las regiones subcostal izquierda y femoral derecha. Después, los presentes inventores estimularon la cicatriz sin tratamiento, la cicatriz donde se ha implantado la lámina de cardiomiocitos o la cicatriz donde se ha implantado la lámina de fibroblastos al ritmo de 300 lpm mediante el mismo estimulador.

(Análisis de datos)

Los datos se presentan como la media  $\pm$  la desviación estándar (SD). Con el fin de evaluar la significación de las diferencias entre los grupos individuales, la evaluación estadística se realizó con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney de dos muestras. La significación estadística se determinó como un valor de p inferior a 0,05.

(Resultados)

(Características de los injertos cardiacos)

Las láminas de cardiomiocitos desprendidas redujeron su tamaño  $5,76 \text{ cm}^2$  a  $1,11 \pm 0,05 \text{ cm}^2$  ( $n=3$ ) en la zona debido a la reorganización del citoesqueleto. Por otro lado, el espesor se incrementó de  $20,1 \pm 0,9 \mu\text{m}$  a  $52,4 \pm 6,0 \mu\text{m}$  ( $n=3$ ). Las láminas cardíacas se contrajeron espontáneamente mediante observación macroscópica.

(Evaluación histológica)

Los presentes inventores pudieron desprender una lámina monocapa de cardiomiocitos a baja temperatura (Figura 6, parte superior izquierda). La lámina de cardiomiocitos se fijó sobre un miocardio infartado inmediatamente después de la implantación sin ligadura (Figura 6, parte superior derecha). 2 semanas después de la implantación, el examen histológico de la tinción con hematoxilina-eosina (HE) de la lámina de cardiomiocitos implantada mostró una buena fijación en alineación sobre el miocardio infartado y sin acumulación de células inflamatorias. La flecha amarilla indica una lámina de colágeno, que es necesaria para liberar la lámina de cardiomiocitos en el miocardio infartado (Figura 7). La inspección visual de la lámina de cardiomiocitos implantada a las ocho semanas de la implantación reveló la unión íntima entre la lámina de cardiomiocitos implantada y un corazón receptor. La tinción con de la lámina de cardiomiocitos implantada después de ocho semanas desde la implantación demostró la integración de la lámina de cardiomiocitos con el miocardio huésped alineación en el centro de la cicatriz (Figura 7, parte inferior derecha). La tinción inmunohistoquímica mostró conexina 43 orientada al azar en la lámina de cardiomiocitos implantada y alrededor de una región de contacto entre la lámina de cardiomiocitos implantada y el corazón receptor (Figura 7, parte central inferior). La tinción inmunohistoquímica con el factor VIII demostró muchas células positivas para el Factor VIII en y alrededor de la lámina de cardiomiocitos implantada (Figura 7, parte inferior izquierda).

(Recuperación funcional del miocardio infartado)

El análisis en modo B mostró que la dilatación del ventrículo izquierdo se había suprimido bien y el movimiento de la pared global estaba bien conservado en el grupo T en comparación con el grupo C (Figura 8). Una fracción de eyección (FE), un acortamiento fraccional (FS) y una zona telediastólica ventricular izquierda (LVESA) basal no fueron significativamente diferentes entre los tres grupos.

2 y 4 semanas después de la implantación, la endocardiografía 2D mostró una mejora significativa de la FE y el FS en el grupo T en comparación con los de los otros grupos. La LVESA fue significativamente menor en el grupo T que en los otros grupos. Estas mejoras funcionales se conservaron 8 semanas después de la implantación (Figura 9).

(Experimentos electrofisiológicos)

Los experimentos electrofisiológicos mostraron el componente de un pico de la onda QRS de la zona de la cicatriz tratada en el grupo T, a pesar de dos picos de la onda QRS como bloques de ramificación en el grupo C (Figura 11). Se observó un efecto en el grupo F, aunque el nivel del efecto fue menor que el del grupo T. Adicionalmente, los experimentos electrofisiológicos demostraron una mejora de la amplitud (voltios) del complejo QRS en el grupo T, a pesar de la baja amplitud en los grupos F y C (grupo C frente al grupo T:  $2,79 \pm 0,9 \text{ V}$  frente a  $0,83 \pm 0,64 \text{ V}$ ,  $P<0,05$ ) (Figura 11).

En el grupo T, cuando se estimuló una aurícula a la frecuencia de 300 lpm mediante un estimulador, se detectaron picos eléctricos simultáneos en el área implantada (Figura 10, parte inferior izquierda). Adicionalmente, un umbral para marcar un corazón receptor fue menor en el grupo T que en los grupos F y C (grupo C frente al grupo F frente al grupo T:  $4,9 \pm 0,9 \text{ V}$  vs  $3. 0 \pm 0. 7 \text{ V}$  vs  $1,7 \pm 0,5 \text{ V}$ ,  $P<0,05$ ) (Figura 10, parte derecha).

(Resultados)

Un dominio respondedor a la temperatura hecho de poli(N-isopropilacrilamida) se injertó en superficies de cultivo celular de poliestireno. Se cultivaron cardiomiocitos de rata recién nacida en estas placas y se desprendieron como una lámina rectangular de células por debajo de  $20^\circ \text{ C}$  sin tripsina. Dos láminas se apilaron para hacer los injertos cardiacos más gruesos. Estas láminas de cardiomiocitos se contrajeron espontáneamente. La observación transversal de las dos láminas demostró una íntima conexión y tejido homogéneo de tipo corazón.

Dos semanas después de la ligadura de la arteria descendente anterior izquierda (ADI) se realizaron dos tratamientos diferentes: 1) implantación de la lámina de cardiomiocitos (grupo T, n = 10); y 2) implantación de la lámina de fibroblastos (grupo F, n = 10). El grupo control no se trató (grupo C, n = 10). La endocardiografía demostró que la función cardíaca mejoró significativamente en el grupo T dos, cuatro, y 8 semanas después de la implantación. La cinesia en color demostró que el movimiento de la pared sistólica regional se recuperaba de manera excelente en comparación con los valores anteriores a la implantación. Las láminas de cardiomiocitos fijadas sobre el miocardio infartado estaban en alineación y parecían ser tejido homogéneo en el miocardio. La tinción inmunohistoquímica demostró neoangiogénesis y conexina 43 orientada al azar en las láminas de cardiomiocitos implantadas. Los experimentos electrofisiológicos mostraron la mejora de la onda R y el componente de un pico del complejo QRS en el área de la cicatriz tratada en el grupo T, a pesar de los componentes de dos picos del complejo QRS como bloqueo de la rama en los grupos F y C. Adicionalmente, un umbral para marcar un corazón receptor fue menor en el grupo T que en los grupos F y C (grupo C frente al grupo F frente al grupo T:  $4,9 \pm 0,9$  V frente a  $3,0 \pm 0,7$  V frente a  $1,7 \pm 0,5$  V,  $P < 0,05$ ).

#### 15 (Discusión)

El reciente desarrollo de miocardiopatía celular introducido mediante inyección con aguja ha proporcionado un nuevo abordaje a la restauración de la función cardíaca deteriorada (Taylor D. A., Atkins B. Z., Hungspreugs P., Jones T. R., Reedy M. C., Hutcheson K. A., Glower D. D., Kraus W. E., *Regeneration of Functional Myocardium: Improved Performance after Skeletal Myoblast Transplantation*, *Nature Med.*, 1998; 4:929-933). Potenciales ventajas adicionales del método de implantación de la lámina de cardiomiocitos son un mejor control del proceso de formación de tejido (la forma, el tamaño, y la consistencia de un injerto), una técnica de implantación fácil, y la implantación de una serie de células con mínima pérdida de células. Por el contrario, un método de inyección proporciona una pérdida de una determinada cantidad de células o de su proteína de la superficie (por ejemplo, conexina 43) por medio de tratamiento con tripsina. Además del infarto de miocardio, el método de implantación de la lámina de cardiomiocitos puede ser útil para la reparación de la disfunción miocárdica mundial (en, miocardiopatía dilatada). Para lograr aplicaciones clínicas, la masa de tejido de miocardio implantado total es de importancia crucial para la reparación del miocardio deteriorado y la mejora de la angiogénesis puede hacer posible que las láminas cardíacas sean más gruesas y liberen más células en el miocardio deteriorado.

En este ejemplo, los presentes inventores han desarrollado una lámina de cardiomiocitos contráctiles sin un armazón y han analizado la función cardíaca y la evaluación histológica después de la implantación. La lámina de cardiomiocitos se ha fijado a un miocardio infartado acompañado de angiogénesis. La lámina de cardiomiocitos parecía tejido de miocitos homogéneo que expresa conexina 43 y se contrajo de forma simultánea *in vivo*. Los cardiomiocitos en lámina de cardiomiocitos exhibieron alineación y pocas células inflamatorias acumuladas en la lámina de cardiomiocitos implantada. La implantación de la lámina de cardiomiocitos prometió una mejora excelente del funcionamiento cardíaco sistólico y diastólico. Los experimentos electrofisiológicos revelaron que la lámina de cardiomiocitos mejora la conductividad eléctrica en la cicatriz y reconstruye el componente de un pico del complejo QRS en el área de la cicatriz tratada. Estos datos demostraron la hipótesis de los presentes inventores de que las láminas de cardiomiocitos contráctiles exhiben integración histológica y eléctrica con el miocardio deteriorado acompañada de angiogénesis y expresión de conexina 43 e induce la mejora significativa de rendimiento cardíaco. Según el mejor conocimiento de los presentes inventores, este es el primer informe donde la terapia de regeneración miocárdica tuvo éxito en el miocardio deteriorado usando una lámina cardíaca de ingeniería tisular.

Los principales factores de integración en la terapia regenerativa son integración dinámica, integración eléctrica e integración histológica.

Respecto a la integración dinámica, los cardiomiocitos de la lámina de cardiomiocitos implantada mostraron alineación y estimularon una mejoría significativa de la función sistólica regional y global en el miocardio infartado. La remodelación deteriorada es responsable de la deformación estructural cardíaca y el deterioro de la función cardíaca en un corazón infartado (Tyagi S.C., *Extracellular Matrix Dynamics in Heart Failure: A Prospect for Gene Therapy*, *J. Cell. Biochem.*, 1998, 68:403-410). Kelley et al. mostraron que la restricción de la dilatación de un ventrículo izquierdo (VI) con una malla colocada sobre un miocardio infartado conserva la geometría del ventrículo izquierdo (VI) y la función de reposo un modelo de infarto de miocardio en ovejas (Kelley S.T., Malekan R., Gorman J. H. et al., *Restraining Infarct Expansion Preserves Left Ventricular Geometry and Function after Acute Anteroapical Infarction*, *Circulation*, 1999, 99:135-142). Aunque tanto la preservación de la geometría del ventrículo izquierdo (VI) como la mejora de una función sistólica regional en tejidos con la función alterada pueden ser esenciales para la reparación de la función sistólica en un corazón deteriorado, solo la atenuación de la dilatación del ventrículo izquierdo (VI) no es un tratamiento adecuado. Los datos de los presentes inventores, en los que las láminas no contráctiles no mejoraron la función sistólica en comparación con las láminas contráctiles apoyan esta conclusión. Además, los datos de los presentes inventores demostraron una angiogénesis significativa en el miocardio infartado. Uno de los mecanismos para la mejora de la función cardíaca puede ser la angiogénesis inducida por una lámina de cardiomiocitos implantada. En resumen, la mejora significativa de la función sistólica inducida por una lámina de cardiomiocitos implantada es responsable de la preservación de la geometría del ventrículo izquierdo (VI), la mejora de la función sistólica regional y la inducción de angiogénesis.

Respecto a la integración eléctrica, el estudio de los presentes inventores demostró que un conductor eléctrico conductividad (es decir, una lámina de cardiomiocitos que expresan conexina 43) estimuló la conductividad en la cicatriz, lo que conduce a la mejora de la amplitud del complejo QRS y la reparación de los componentes de dos picos del bloqueo de rama del complejo QRS en el miocardio infartado. Los patrones de bloqueo de rama es probable que estén relacionados con fibrosis o necrosis en el miocardio (Agarwal A. K., Venugopalan P., Right Bundle Branch Block: Varying Electrocardiogram Patterns., An Etiological Correlation, Mechanisms and Electrophysiology, International Journal of Cardiology, 1999, 71:33-39). El cambio histológico se reflejó a la amplitud del complejo QRS en el registro electrocardiográfico (Sakamoto A., Ono K., Abe M., Jasmin G., Eki T., Murakami Y., Masaki T., Toyo-oka T., Hanaoka F., Both Hypertrophic and Dilated Cardiomyopathies Are Caused by Mutation of the Same Gene, delta-sarcoglycan, en Hamster: An Animal Model of Disrupted Dystrophin-associated Glycoprotein Complex, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Dec 9, 1997, 94 (25):13873-8). Los hechos del movimiento simultáneo de la pared demostrados en EE.UU., la reparación de los componentes de dos picos del bloqueo de rama de tipo complejo QRS y la disminución de un umbral en la cicatriz podrían revelar una conexión eléctrica entre una lámina de cardiomiocitos implantada y un miocardio huésped. Por esta razón, las láminas de células mantuvieron una buena condición de la superficie con la conexina 43, cuando los presentes inventores usaron placas respondedoras a la temperatura, y no tripsina, para desprender las láminas de células de las placas de cultivo.

Respecto a la integración histológica, las láminas de cardiomiocitos implantadas mostraron una buena fijación con el miocardio infartado con angiogénesis. Ya, los presentes inventores demostraron que la integración histológica mediante la mejora de las interacciones célula / célula y célula / MEC por un factor de crecimiento en la sangre es esencial para la regeneración miocárdica del miocardio infartado (Miyagawa S., Sawa Y., Taketani S., Kawaguchi N., Nakamura T., Matsuura N., Matsuda H., Myocardial Regeneration Therapy for Heart Failure, Hepatocyte Growth Factor Enhances the Effect of Cellular Cardiomyoplasty, Circulation, 2002, 105: 2556-2561). Kushida et al. informaron de que los agentes adhesivos en las láminas de células estaban bien conservados después del desprendimiento de las placas respondedoras a la temperatura (Kushida A., Yamato M., Konno C., Kikuchi A., Sakurai Y., Okano T., J. Biomed. Mater. Res. 45:355-362, 1999). Por lo tanto, estas láminas muestran una buena fijación e integración con varios órganos con una buena preservación de las moléculas adhesivas en su superficie (Shimizu T., Yamato M., Kikuchi A., et al., Two-dimensional Manipulation of Cardiac Myocyte Sheets Utilizing Temperature-responsive Culture Dishes Augments the Pulsatile Amplitude, Tissue Eng., 2001, 7(2):141-51, 24; y von Recum H.A., Kim S.W., Kikuchi A., Okuhara M., Sakurai Y., Okano T., Retinal Pigmented Epithelium Culture on Thermally Responsive Polymer Porous Substrates, J. Biomater. Sci. Polym. Ed 9: 1998, 1241-1254). Además, la liberación de células con preservación de la comunidad celular puede ser importante para la supervivencia y la viabilidad de las células en contraste con la liberación de las células a través de un método de inyección. Estos resultados indican que las láminas de cardiomiocitos sin armazones hacen un sincitio con un miocardio huésped.

Una fuente de células para las láminas es un asunto muy importante en aplicaciones clínicas. Recientemente, los mioblastos son los más ampliamente utilizados para aplicaciones clínicas de trasplante de células. Los mioblastos tienen un potencial de tolerancia isquémica en lugar de los cardiomiocitos. Por lo tanto, los mioblastos son una de las fuentes de células adecuadas para la implantación de láminas de células en aplicaciones clínicas en la actualidad.

En conclusión, los presentes inventores han demostrado que las láminas de cardiomiocitos contráctiles integrados con un miocardio deteriorado dinámicamente, eléctricamente e histológicamente.

La implantación de láminas de cardiomiocitos puede ser una nueva y prometedora estrategia para la reparación del rendimiento funcional y la estructura cardíaca en el miocardio deteriorado.

Las láminas de fibroblastos también proporcionan una ligera mejora que es menor que la de las láminas de las células del corazón. Por tanto, se demostró que las láminas de fibroblastos tienen un potencial de uso al menos para primer auxilio.

(Conclusión)

Un tejido protésico utilizando cardiomiocitos de rata recién nacida integrado con miocardio alterado y mejoró la función cardíaca en un modelo cardíaco de isquemia. Aunque los presentes inventores en el presente documento utilizaron cardiomiocitos, un tejido protésico organizado utilizando una técnica de lámina de células introduce un nuevo concepto de implantación de tejido y es útil en el campo de la medicina regenerativa. Esta técnica se muestra esquemáticamente en las Figuras **1A** y **1B**.

(Ejemplo 2 (Referencia))

(La lámina de mioblastos autoderivada regenera el miocardio deteriorado: Un camino a la aplicación clínica, ejemplos demostrativos usando ratas)

Es probable que los recientes avances en la ingeniería de tejidos proporcionen un tejido funcional implantable que comprende varias células distintas de las células miocárdicas, y matrices extracelulares. Los presentes inventores

diseñaron láminas de mioblastos autólogos. Los presentes inventores consideraron que estas láminas son beneficiosas para aplicaciones clínicas. Por tanto, en este ejemplo, los mioblastos se utilizaron como material para la construcción de un tejido protésico o estructura tridimensional y se demostró un efecto del tejido protésico o estructura tridimensional en aplicaciones clínicas.

5

(Métodos)

Se creó un corazón deteriorado en 28 ratas mediante ligadura de la arteria descendente anterior izquierda (DAI) durante 2 semanas. Un dominio respondedor a la temperatura hecho de un polímero de (N-isopropilacrilamida) se recubrió en placas de cultivo. Mioblastos esqueléticos (ME) aislados del músculo de la pierna se cultivaron y se desprendieron de las placas como una lámina de células en monocapa (tejido) a 20 °C (Figura 13). Se implantaron dos láminas de mioblastos en nueve ratas (grupo (S) de la lámina de mioblastos =  $10^7$  células). Las células mioblastos se inyectaron en 9 ratas (grupo I =  $10^7$  células). Se realizó una terapia no celular en 10 ratas (grupo C = solo se inyectó medio).

15

(Medición de la función cardíaca)

Se operó a las ratas con anestesia. La función cardíaca se monitorizó los días 14 y 28 después de la operación. Se usó un dispositivo de ultrasonidos (SONOS 5500) con un transductor de matriz anular de 12 MHz para realizar una endocardiografía (Figura 18). Se realizaron imágenes en el eje corto paraesternal e imágenes en el eje largo paraesternal en los modos de obtención de imágenes B y M. Además de la presión de la pared anterior, se midieron los parámetros globales (por ejemplo, el diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo, el diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo, el acortamiento fraccional y la fracción de eyección) (Figura 14).

25

(Histología)

2 y 4 semanas después, se sacrificó a las ratas con exceso de pentobarbital y se extirparon los corazones. Los corazones se fijaron con formaldehído al 10 % y se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones en serie de 5 mm de espesor desde la base a la punta del corazón a lo largo de un eje longitudinal del mismo usando un baño de baja temperatura. A continuación, se realizó un tratamiento para histología estándar (como se muestra en las Figuras 15 y 17, la tinción con hematoxilina-eosina se realizó para la visualización de los músculos y la tinción tricrómica de Masson para evaluar el contenido de colágeno se realizó para la evaluación del contenido de colágeno).

35

(Resultados)

(Efecto de la implantación de mioblastos sobre la función cardíaca)

Según los experimentos, el infarto de miocardio tuvo como resultado una mortalidad aguda de menos del 20 % en un plazo de 24 horas después de la operación. El procedimiento de implantación de células no causó la muerte de más animales.

40

La remodelación ventricular causó característicamente un aumento de tamaño global de la cavidad cardíaca y fallo de la bomba. A las 2, 4 y 8 semanas de la operación, el grupo de tejido (grupo ME) y el grupo de IM sufrieron una disminución significativa del diámetro del ventrículo izquierdo y tanto la zona telediastólica ventricular izquierda (LVEDA) como la zona telesistólica ventricular izquierda (LVESA) mejoraron después del tratamiento. Además, el valor de la fracción de eyección (FE) de valor y el valor del acortamiento fraccional (FS) del grupo de la lámina de mioblastos también fueron elevados en comparación con los del grupo de IM (Figura 19).

45

Los corazones en el grupo de control que no fueron sometidos a la terapia celular mostraron una dilatación adicional de un ventrículo, hipertrofia de una pared anterior, y valores claramente bajos de la fracción de eyección (FE) y del acortamiento fraccional (FS).

50

(Observaciones histológicas)

La histología reveló que los corazones deteriorados del grupo de IM tenían una pared dilatada con un espesor no uniforme (Figura 20), y no contenían sustancialmente parches de células implantadas (Figura 21). En contraste con ello, el corazón infartado con la lámina implantada tenía una pared que no dilataba y era uniformemente gruesa, y estaba celularizada adecuadamente, y no tenía cicatrices. La supervivencia de la lámina implantada se identificó a las 2, 4 y 8 semanas después de la implantación.

60

La pérdida técnica de células de implantación se analizó mediante RT-PCR basada en la presencia del cromosoma Y. Como resultado, la pérdida fue menor a los 15 minutos y 1 día después de la operación en el grupo ME que en el grupo IM ( $3,7 \pm 0,5$  % frente a  $1,7 \pm 0,5$  % del número total de células del corazón).

65

(Fotografías secuenciales)

Al tomar una imagen en movimiento, se confirmó que la implantación de mioblastos de la presente invención realmente causaba pulsación (Figuras **22A-F** a **29**).

5 Las figuras **22A** a **22F** muestran una representación de imagen en movimiento de un resultado de un examen electrofisiológico, presentando marcos representativos (imágenes fijas). Las figuras **22A** a **22C** indican el control, y las Figuras **22D** a **22F** indican los resultados de una lámina de mioblastos de la presente invención.

10 Las figuras **23A** a **23C** muestran una representación de imagen en movimiento de la expresión de GFP, presentando marcos representativos (imágenes fijas). Se observa que una lámina de mioblastos de la presente invención en realidad era pulsátil.

15 Las figuras **24A** a **24C** muestran una representación de imágenes en movimiento de una ultraecografía de un corazón infartado tratado de acuerdo con la presente invención, presentando marcos representativos (imágenes fijas).

20 Las figuras **25A** a **25C** también muestran una representación de imágenes en movimiento de una ultraecografía de un corazón infartado tratado de acuerdo con la presente invención, presentando marcos representativos (imágenes fijas). La parte izquierda de la figura muestra un corazón infartado control, mientras que la parte derecha muestra un resultado de una lámina de mioblastos de la presente invención. Como puede verse en la figura, la presente invención curó sustancialmente el infarto, de forma que el corazón latía sustancialmente con normalidad.

25 Las Figuras **26A** a **26C** es una fotografía que muestra la misma muestra que en las Figuras **25A** a **25C** a diferentes puntos de tiempo. Como puede verse a partir de estas figuras, el corazón infartado se curó sustancialmente por la presente invención.

30 Las figuras **27A** a **27C** muestran una representación de imágenes en movimiento de una ultraecografía de un corazón infartado tratado de acuerdo con la presente invención, presentando marcos representativos (imágenes fijas). Como puede verse en la figura, el infarto se curó mediante el tratamiento de la presente invención.

(RT-PCR)

35 A continuación, con el fin de mostrar afinidad celular, el número de células implantadas se cuantificó mediante RT-PCR. En este ejemplo, el número de copias de genes se evaluó mediante el ensayo de TaqMan para SRYe IL 2.

La RT-PCR se realizó usando un cebador que era una parte de un gen derivado del cromosoma Y en las células masculinas. Al medir la cantidad del gen en los cromosomas de un huésped femenino, se confirmó la afinidad.

40 Se usó el siguiente cebador.

Como una solución de reacción se utilizó la siguiente solución de reacción mixta para PCR.

Mezcla universal (proporcionada por el fabricante)	12,5 µl
Cebador directo (100 µM)	0,05 µl
Cebador inverso (100 µM)	0,05 µl
Sonda (50 µM)	0,1 µl
dH <sub>2</sub> O	10,3 µl
Molde (ADN)	2,0 µl

45 Las secuencias de los cebadores y la sonda se describen a continuación.

SRY (cebador directo) GCC TCA GGA CAT ATT AAT CTC TGG AG (SEC ID N° 15)

(cebador inverso) GCT GAT CTC TGA ATT CTG CAT GC (SEC ID N° 16)

(sonda) AGGCGCAAGTTGGCTCAA CAG AAT CC (SEC ID N° 17)

50 IL2 (cebador directo) GCC TTG TGT GTT ATA AGT AGG AGG C (SEC ID N° 18)

(cebador inverso) AGT GCC AAT TCG ATG ATG AGC (SEC ID N° 19)

(sonda) TCT CCT CAG AAA TTC CAC CAC AGT TGC TG (SEC ID N° 20)

55 Se usaron 100 ng de cada ADN genómico para realizar la PCR. La solución de reacción mezclada se introdujo en pocillos de placas de reacción MicroAmp Optical de 96 pocillos. Los pocillos se taparon con patas MicroAmp Optical Caps. Las burbujas de aire se eliminaron brevemente y se recogió el líquido presente en el fondo de cada pocillo. Cada gen se midió por triplicado. La PCR se realizó utilizando el sistema de detección de secuencias ABI Prism

7700.

El ADN estándar fue el siguiente: (200 ng. 40 ng. 8 ng, 1,6 ng 0,32 ng 0,064 ng); (SRY 200 ng =  $3 \times 10^4$  copias; IL2 200 ng =  $6 \times 10^4$  copias).

5 Los parámetros para el ciclado térmico se describieron a continuación.

Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3
50 °C/2 min	95 °C/10 min	40 ciclos de 95 °C/15 s - 60 °C/1 min

El índice de células masculinas se obtuvo mediante la siguiente expresión:

$$10 \quad (2 \times \text{SRY} / \text{IL2}) \times 100$$

Como resultado, como se muestra en la Figura 28, se demostró que la implantación de la lámina (tejido tridimensional) tiene un nivel más satisfactorio de afinidad que la de la implantación de aguja (la propia célula).

15 (Demostración de celularidad)

Se examinó en qué tipo de células contenidas en una lámina de cardiomiocitos implantada se diferenciaban.

20 Por lo tanto, se realizaron tinción tricrómica de Masson, tinción con HE (hematoxilina-eosina), tinción rápida de MHC y tinción lenta de MHC.

Estos procedimientos se realizaron del siguiente modo.

25 <Tinción tricrómica de Masson>

La tinción tricrómica de Masson se realiza del siguiente modo. La tinción tricrómica de Masson tiñe los núcleos con hematoxilina férrica. Después, las pequeñas moléculas de pigmento (fucsina ácida, xilidina de ponceau) que tienen una velocidad de difusión alta entran en los canales reticulares y, después, las moléculas grandes de pigmento (azul anilina) que tienen una velocidad de difusión baja entran en la estructura en bruto de las fibras de colágeno, tiñendo de este modo la célula de azul.

La tinción tricrómica de Masson utiliza los siguientes reactivos.

A) Colorante mordiente

35 solución acuosa de ácido tricloroacético al 10 % 1 parte

solución acuosa de dicromato potásico al 10 % 1 parte

B) Solución de hematoxilina férrica de Weigert (cantidades iguales de la solución 1 y la solución 2 se mezclan en uso)

Solución 1

hematoxilina 1 g  
etanol al 100 % 100 ml

Solución 2

cloruro férrico 2,0 g  
ácido clorhídrico (25 %) 1 ml  
agua destilada 95 ml

40 C) Ácido clorhídrico al 1 % y alcohol al 70 %

D) Solución I

1 % de rojo Biebrich 90 ml  
1 % de fucsina ácida 10 ml  
ácido acético 1 ml

E) Solución II

Ácido fosfomolibdico 5 g  
Ácido fosfotúngstico 5 g  
agua destilada 200 ml

45 F) Solución III

Azul anilina 2,5 g  
ácido acético 2 ml  
agua destilada 100 ml

G) Agua ácido acético al 1 %

Procedimiento para la tinción tricrómica de Masson:

- 5 1. Desparafinación, lavado con agua, el agua destilada;
2. Aplicación de mordiente (de 10 a 15 minutos);
3. Lavado con agua (5 minutos);
4. Solución de hematoxilina férrica de Weigert (5 minutos);
5. Lavado ligero con el agua;
- 10 6. Separación con ácido clorhídrico al 1 % y alcohol al 70 %;
7. Desarrollo de color, lavado con agua (10 minutos);
8. Agua destilada;
9. Solución I (de 2 a 5 minutos);
10. Lavado ligero con el agua;
- 15 11. Solución II (30 minutos o más);
12. Lavado ligero con el agua;
13. Solución III (5 minutos);
14. Lavado ligero con el agua;
15. Ácido acético al 1 % /agua (5 minutos);
- 20 16. Lavado con agua (rápido); y
17. Deshidratación, limpieza, montaje.

25 Con la tinción tricrómica de Masson, las fibras de colágeno, las fibras reticulares y la membrana basal glomerular se tiñen intensamente de azul, los núcleos se tiñen de negro-violeta, el plasma se tiñe de rojo claro, los eritrocitos se tiñen de color naranja-amarillo a rojo intenso, el moco se tiñe de azul, los gránulos basófilos se tiñen de azul y los gránulos eosinófilos se tiñen de rojo, y la fibrina se tiñen de color rojo. Por lo tanto, un área teñida de azul se puede calcular como un sitio fibroso.

<Tinción con hematoxilina-Eosina (HE)>

30 La aceptación o desaparición de células en una lámina se observó mediante tinción con HE. El procedimiento se describe del siguiente modo. Una muestra se desparafina opcionalmente (por ejemplo, con etanol puro), seguido de lavado con agua. La muestra se sumerge en hematoxilina de Omni durante 10 minutos. Posteriormente, la muestra se lava con agua corriente, seguido de desarrollo del color con agua de amoníaco durante 30 segundos.

35 Posteriormente, la muestra se lava con agua corriente durante 5 minutos y se tiñe con una solución de clorhidrato de eosina durante 2 minutos, seguido de deshidratación, limpieza y montaje.

<Tinción rápida con MHC>

40 MIOSINA MONOCLONAL ANTI-ESQUELÉTICA (RÁPIDA)  
CADENA PESADA DE LA MIOSINA: MY-32 (mioblastos esqueléticos)

Reactividad específica con ratas y seres humanos

- 45 1. Se preparan secciones de 5  $\mu$ m de espesor a partir del bloque congelado.
2. Las secciones se fijan en acetona a -20 °C durante 5-10 minutos.  
(Los bloques de parafina deben desparafinizarse y rehidratarse).
3. La actividad de peroxidasa endógena se bloquea en 0,3 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol durante 20 minutos a TA.  
(1 ml de 30 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 99 ml de metanol)
- 50 4. Se lava con PBS (3  $\times$  5 minutos).
5. Se incuban con el anticuerpo monoclonal primario (MY-32) en la cámara húmeda a 4 °C durante toda la noche  
(1  $\mu$ l de anticuerpos + 200  $\mu$ l de PBS por portaobjetos).
6. Al día siguiente, se lavan con PBS (3 $\times$ 5 minutos).
7. Se aplica link biotinilado anti-ratón y anticonejo n° 1 durante 30 minutos -1 hora a TA.  
(se aplican aproximadamente 3 gotas directamente sobre el portaobjetos).
- 55 8. Se lava con PBS (3  $\times$  5 minutos).
9. Se aplican aproximadamente 3 gotas directamente de estreptavidina GRP N° 2 para LSAB. 10-15 minutos.
10. Se lava con PBS (3  $\times$  5 minutos).
11. Se aplica DAB (5 ml de DAB+5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
- 60 12. Se observa al microscopio para ver un color parduzco.
13. Se sumergen en agua durante 5 minutos.
14. Se aplica HE durante 30 segundos-1 minuto.
15. Se lavan unas veces.
16. Intercambio iónico se lava con agua 1 vez.
- 65 17. Se lava con etanol al 80 % durante 1 minuto.
18. Se lava con etanol al 90 % durante 1 minuto.

19. Se lava con etanol al 100 % durante 1 minuto (3 veces).
20. Se lava con xileno durante 1 minuto (3 veces). Cubreobjetos.
21. Se examina el desarrollo de color.

5 <Tinción lenta con MHC>

Antimiosina monoclonal: (esquelético lento)

Reactividad específica con perros, ratas y seres humanos

- 10 1. Se elaboran secciones de 5  $\mu$ m de espesor a partir del bloque congelado.
2. Las secciones se fijaron en acetona a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5-10 minutos.  
(Los bloques de parafina deben desparafinizarse y rehidratarse).
- 15 3. La actividad de peroxidasa endógena se bloquea en 0,3 % de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en metanol durante 20 minutos a TA.  
(1 ml de 30 % de  $\text{H}_2\text{O}_2$ + 99 ml de metanol)
4. Se lava con PBS (3  $\times$  5 minutos).
5. Se incuban con el anticuerpo monoclonal primario NOQ7 en la cámara húmeda a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche  
(1  $\mu$ l de anticuerpos + 200  $\mu$ l de PBS por portaobjetos).
- 20 6. Al día siguiente se lava con PBS (3  $\times$  5 minutos).
7. Se aplica una unión biotinilada anti-ratón y anticonejo n° 1 durante 30 minutos -1 hora a TA.  
(se aplican aproximadamente 3 gotas directamente sobre el portaobjetos).
8. Se lava con PBS (3  $\times$  5 minutos).
9. Se aplican aproximadamente 3 gotas directamente de estreptavidina GRP N° 2 para LSAB. 10-15 minutos.
10. Se lava con PBS (3  $\times$  5 minutos).
- 25 11. Se aplica DAB (5 ml de DAB + 5  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ).
12. Se observa al microscopio para ver un color parduzco.
13. Se sumergen en agua durante 5 minutos.
14. Se aplica HE durante 30 segundos-1 minuto.
15. Se lavan unas veces.
- 30 16. Intercambio iónico se lava con agua 1 vez.
17. Se lava con etanol al 80 % durante 1 minuto.
18. Se lava con etanol al 90 % durante 1 minuto.
19. Se lava con etanol al 100 % durante 1 minuto (3 veces).
20. Se lava con xileno durante 1 minuto (3 veces). Cubreobjetos.
- 35 21. Se examina el desarrollo de color.

Como resultado, como se muestra en la Figura 29, se demostró que la lámina de mioblastos implantada se diferenciaba desde fibras rápidas a fibras lentas. Estos marcadores se pueden usar para identificar una estructura de tejido tridimensional de la presente invención.

40 (Conclusión)

La implantación de mioblastos esqueléticos atenuó la remodelación del corazón y regeneró el miocardio deteriorado para mejorar la función cardíaca global, en comparación con la implantación de células. Este hallazgo sugiere una estrategia prometedora para la terapia regenerativa de miocardio.

50 Por lo tanto, se demostró que cuando una lámina de mioblastos se implantaba como una estructura tridimensional, la función cardíaca del miocardio deteriorado mejoraba. En este ejemplo, mediante el uso de inyección directa, la implantación de mioblastos esqueléticos (ME) autólogos se aplicó clínicamente. La pérdida de células implantadas y de la matriz extracelular (MEC) implantada debido a la inyección directa limita el número de mioblastos esqueléticos y la capacidad de los mioblastos esqueléticos.

55 En cuanto a las pruebas clínicas que utilizan una fuente de células autólogas, se utilizan preferentemente mioblastos autólogos. También se demostró que la implantación de tejido es más ventajosa para regenerar un corazón lesionado que la implantación de células.

(Ejemplo 3 (Referencia): Mioblastos esqueléticos- Implantación de lámina de mioblastos de ingeniería de tejidos mejora la función cardíaca con atenuación de la remodelación cardíaca en hámsteres con miocardiopatía)

60 A continuación, se examinó si un tejido protésico o estructura tridimensional producida utilizando mioblastos esqueléticos mejora o no la miocardiopatía.

65 La terapia celular es una estrategia prometedora para la miocardiopatía isquémica. Sin embargo, los métodos de inyección directa parecen tener limitaciones para la liberación celular generalizada en la miocardiopatía dilatada (MCD). Teniendo en cuenta este conjunto de pruebas, los presentes inventores consideraron que una implantación de una lámina de mioblastos de ingeniería de tejidos podría ser un método superior y prometedor para mejorar la

función cardíaca en la MCD. Por lo tanto, los presentes inventores llevaron a cabo este ejemplo.

(Método)

- 5 Se usaron hámsteres macho de 27 semanas de edad BIO A-2 (miocardiopatía dilatada (MCD)) que mostraban la remodelación cardíaca moderada como receptores. Los mioblastos aislados de los hámsteres BIO FIB (FIB) se cultivaron en placas injertadas con un polímero respondedor a la temperatura hecho de poli (N-isopropilacrilamida) y se desprendieron como una lámina de células a 20 ° C sin tratamiento enzimático.
- 10 Se realizaron tres tratamientos diferentes: (1) Grupo de implantación de lámina de mioblastos (grupo S, n = 8); (2) grupo de inyección de mioblastos (aislados de FIB) (grupo T, n = 10); y (3) grupo de operación simulada (grupo C, n = 10). En el grupo S, se implantó una lámina de mioblastos en la pared del ventrículo izquierdo (VI). En el grupo T, los mioblastos se inyectaron en la pared del ventrículo derecho (VD) y en la pared del ventrículo izquierdo (VI).

15 (Resultados)

(Recuperación funcional del miocardio infartado)

20 El análisis en modo B demostró que la dilatación del ventrículo izquierdo se había suprimido adecuadamente y el movimiento de la pared global estaba adecuadamente conservado en el grupo T en comparación con el grupo C (Figura 18).

25 Después de implantar la lámina de mioblastos, un ecograma de ultrasonidos demostró que la dimensión del VI dilatado se redujo significativamente, mientras que los corazones de los grupos T y C mostraron una progresión de la dilatación del ventrículo izquierdo (VI) (Figura 33A). Seis semanas después de la operación, el acortamiento fraccional (FS) mejoró significativamente en los grupos S y T en comparación con el grupo C. Después de siete semanas, el FS en el grupo S se mantuvo en el nivel preoperatorio, mientras que el FS en los otros grupos disminuyó gradualmente. Aunque la velocidad máxima de la onda E en la válvula mitral en el grupo S disminuyó ligeramente una semana después de la implantación de la lámina, se recuperó hasta el nivel preoperatorio 2 semanas después de la operación. El promedio de la onda E en los grupos S y T fue significativamente mayor que en el grupo C 4 semanas después de la operación y después de eso. Los exámenes histológicos en el grupo S demostraron que la lámina implantada casi cubría todo el corazón y el espesor de la pared del ventrículo izquierdo (VI) se incrementó con los mioblastos supervivientes (Figuras 30A a 30D). Como puede verse en la Figura 30B, los mioblastos implantados, que constituyen una estructura de tejido, estaban íntimamente unidos a, y aceptados por, el corazón para ayudar a la función cardíaca. Las Figuras 30C y 30D muestran claramente que la expresión de  $\alpha$ -sarcoglicano y  $\beta$ -sarcoglicano tenía una puntuación de 2 a 3 y aproximadamente 3, respectivamente, es decir, el corazón se había recuperado sustancialmente moderadamente, donde la expresión normal tiene una puntuación de 5 y los hámsteres DCM tienen una puntuación de aproximadamente 3. Se sabe que los hámsteres DCM tienen un síntoma de miocardiopatía dilatada parcial causada por una disminución en la expresión de sarcoglicano. Se demostró que una estructura de tejido tridimensional de la presente invención tiene un efecto de suplementar dicha expresión génica.

45 La Figura 33B muestra claramente que el uso de la estructura de tejido tridimensional de la presente invención permitía a los hámsteres DCM sobrevivir más allá de 48 semanas. Este es un efecto significativo e inesperado en comparación con la inyección (sólo las células) o el control (en cualquier caso, todos los hámsteres DCM murieron después de 38 a 40 semanas). Como se muestra en la Figura 33C, la contractilidad del ventrículo izquierdo con miocardiopatía dilatada mejoró significativamente. Este resultado muestra que la estructura de la presente invención se puede aplicar a los corazones. El resultado corresponde a aproximadamente una extensión de 25 años de duración de la vida, lo que demuestra un efecto significativo de la estructura de tejido tridimensional de la presente invención. El promedio de vida de los hámsteres DCM fue de aproximadamente 40 semanas, mientras que la más larga vida útil de los hámsteres DCM que tienen una lámina implantada fue de aproximadamente 70 semanas. Suponiendo que el tiempo de vida de un hámster normal es de aproximadamente 2 años y la duración de la vida de un ser humano es de 80 años, el tiempo de vida del hámster implantado se prolongó en aproximadamente 30 semanas, que es equivalente a aproximadamente 25 años en un ser humano. Por lo tanto, se demostró que la estructura tridimensional de la presente invención tiene un efecto significativo sobre la miocardiopatía.

(Conclusión)

60 La implantación de láminas de mioblastos redujo la progresión de la hipertrofia cardíaca con una mejoría de la función cardíaca en corazones con miocardiopatía dilatada (MCD). La implantación de láminas de mioblastos puede ser un método prometedor para restaurar la función cardíaca con atenuación de la remodelación cardíaca en corazones de MCD.

(Ejemplo 4 (Referencia): Terapia para el modelo de infarto en cerdos)

En este ejemplo, de objetivo encontrar más hallazgos clínicos, se implantaron láminas de mioblastos esqueléticos se en un modelo de infarto de miocardio en un animal más grande para estudiar la mejora de la función cardíaca.

5 (Método)

Se realizó una toracotomía en cerdos de 30 kg de peso con anestesia general y la DAI se ligó para producir modelos de infarto de miocardio. Se realizaron tres tratamientos diferentes: 1) Grupo de lámina de mioblastos esqueléticos; 2) Grupo de inyección de mioblastos esqueléticos; y 3) grupo de control. Para estos grupos, los cambios en la función cardíaca y el tejido miocárdico se examinaron (Figura 34). Mioblastos esqueléticos se obtuvieron de músculo del muslo antólogo. Se prepararon colagenasa, tripsina EDTA, sulfato de gentamicina y anfotericina B y se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm para formular una solución de disociación. Se prepararon medio basal SkBM, suero bovino fetal, EGF, fosfato sódico de dexametasona, sulfato de gentamicina, y anfotericina B y se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm para formular medio de cultivo primario. Las células disociadas se cultivaron en placas injertadas con una macromolécula respondedora a la temperatura hecha de poli (N-isopropilamida) y se desprendieron como una lámina de células cambiando la temperatura en lugar del tratamiento enzimático.

20 (Resultados)

En el grupo con implantación de lámina de células mejoraron las funciones cardíacas, es decir, la contractilidad y la extensibilidad (Figuras 35 y 36). Además, se confirmó que las células implantadas fueron aceptadas por la parte de infarto de miocardio.

25 (Conclusión)

En experimentos con animales distintos de los roedores, se confirmó que una terapia usando una lámina de mioblastos de la presente invención se produjo un efecto de mejora de la función cardíaca.

30 (Ejemplo 5: células sinoviales)

Para demostrar un efecto de la presente invención en el caso de otro tipo de células, se preparó una lámina de células sinoviales (células que contienen células madre de tejido) y se implantó en modelos de infarto de miocardio para examinar un efecto de mejora de la función cardíaca.

35 (Métodos)

Se extrajeron las articulaciones de la rodilla de ratas de 8 semanas de edad. El tejido sinovial se cortó de la superficie interna de la articulación. El tejido se unió a un medio de cultivo que contiene 20 % de FCS y DMEM rico en glucosa para el cultivo celular. Las células resultantes se cultivaron en placas injertadas con una macromolécula respondedora a la temperatura hecha de poli (N-isopropilamida) y se desprendieron como una lámina de células cambiando la temperatura en lugar del tratamiento enzimático. Para los modelos de infarto de miocardio preparados mediante ligadura de la ADI, se realizaron tres tratamientos diferentes: 1) grupo de lámina de células; 2) grupo de inyección de células; y 3) grupo de control. Para estos grupos, los cambios en la función cardíaca y el tejido miocárdico se examinaron.

(Resultados)

50 En el grupo con implantación de lámina de células mejoraron las funciones cardíacas, es decir, la contractilidad y la extensibilidad. Además, se confirmó que las células implantadas fueron aceptadas por la parte de infarto de miocardio.

(Conclusión)

55 En el caso de células diferenciadas a partir de células obtenidas de tejido sinovial, se confirmó que una lámina de tales células tenía un efecto de mejora de la función cardíaca.

(Ejemplo 6 (Referencia): células madre)

60 Como ejemplo de células no diferenciadas, existe una célula madre embrionaria de ratón que se sabe que es capaz de diferenciarse en un cardiomiocito. En este ejemplo, se preparó una lámina de tales cardiomiocitos y se implantó en modelos de infarto de miocardio para estudiar el efecto sobre la mejora de la función cardíaca.

## (Métodos)

Un gen de resistencia se introdujo en un sitio promotor de un gen que expresa MHC en las células madre embrionarias de ratón. Las células se cultivaron en un cultivo selectivo que contiene una alta concentración de un fármaco donde las células diferenciadas en algo distinto a los cardiomiocitos son destruidas, de manera que se seleccionaron los cardiomiocitos. Las células resultantes se cultivaron en placas injertadas con una macromolécula respondedora a la temperatura hecha de poli (N-isopropilamida) y se desprendieron como una lámina de células cambiando la temperatura en lugar del tratamiento enzimático. Para los modelos de infarto de miocardio preparados mediante ligadura de la ADI, se realizaron tres tratamientos diferentes: 1) grupo de lámina de células; 2) grupo de inyección de células; y 3) grupo de control. Para estos grupos, los cambios en la función cardíaca y el tejido miocárdico se examinaron.

## (Resultados)

En el grupo con implantación de lámina de células mejoraron las funciones cardíacas, es decir, la contractilidad y la extensibilidad. Además, se confirmó que las células implantadas fueron aceptadas por la parte de infarto de miocardio.

## (Conclusión)

En el caso de células diferenciadas a partir de células obtenidas de tejido sinovial, se confirmó que una lámina de tales células tenía un efecto de mejora de la función cardíaca.

## (Ejemplo 7 (Referencia): Preparación de tejido prostático usando ácido ascórbico)

A continuación, se estudió la influencia de ácido ascórbico o de un derivado del mismo en la producción de un tejido protésico.

Después de producir una cantidad adecuada de mioblastos, se cultivaron  $5 \times 10^6$  células en placas de cultivo de 10 cm respondedoras a la temperatura. Para el cultivo, se utilizó medio basal SkBM (Clonetics (Cambrex)). Después, al medio se añadió ácido 2-fosfato-ascórbico (0,5 mM), ácido ascórbico de magnesio 1-fosfato (0,1 mM), y L-ascorbato de sodio (0,1 mM). 4 días después del inicio del cultivo se desprendieron las células a 20 ° C. Como control, se preparó un tejido protésico en un sistema de cultivo sin ácidos ascórbicos.

## (Resultados)

Cuando se añadió el ácido ascórbico, el tejido protésico se desprendió mucho más fácilmente que en el sistema de cultivo sin ningún tipo de ácido ascórbico. Además, el tejido no se cultivó a un tamaño de varios milímetros en el sistema de cultivo sin ácidos ascórbicos. Si el tejido excede dicho tamaño, se producían grietas y el crecimiento se detuvo. También fue sustancialmente difícil desprender el tejido. Por lo tanto, no se pudo proporcionar tejido protésico implantable. En contraste, un tejido protésico de la presente invención, que se cultivó en un medio suplementado con un ácido ascórbico, creció hasta un tamaño implantable, y fue fácil de desprender. Además, se aisló el tejido protésico, al tiempo que no se generó sustancialmente ningún agujero o cicatriz. La inspección de las conexiones biológicas demostró que la interacción mediada por la matriz extracelular era significativa (Figuras 37 a 39).

## (Ejemplo 8 (Referencia): Efecto de la adición de ácido ascórbico 2-fosfato)

A continuación, se estudió la influencia de ácido ascórbico 2-fosfato o sobre la producción de un tejido protésico.

Después de producir una cantidad adecuada de células sinoviales o mioblastos, se cultivaron  $5 \times 10^6$  células en placas de cultivo de 10 cm respondedoras a la temperatura. Para el cultivo, se utilizó medio basal SkBM (mioblastos) que contenía ácido ascórbico 2-fosfato (1 mM) o DMEM (células sinoviales) que contiene ácido ascórbico 2-fosfato (1 mM). Como control, se preparó un tejido protésico en un sistema de cultivo que tiene el mismo medio sin ácidos ascórbicos o en otro sistema de cultivo que tiene el mismo medio con ácido ascórbico 1-fosfato (1 mM).

9 días después del inicio del cultivo, el tejido se desprendió y se contrajo. El tejido se contrajo en un factor de aproximadamente 3.

El tejido contraído se analizó histológicamente mediante tinción HE o similar (Figura 42, células sinoviales). Se encontró que las células construían 10 o más capas y la matriz estaba en forma de malla de colágeno o esponja. La matriz tenía una rigidez tal que la matriz podía pinzarse fácilmente con pinzas.

(Examen de distorsión por estrés (ensayo de tracción))

Para confirmar la resistencia se llevó a cabo un ensayo de tracción para obtener una curva del tiempo de carga (distorsión por estrés) donde se estira una muestra. Según esta curva se obtienen el límite de proporcionalidad, el módulo de elasticidad, el punto de rendimiento, la resistencia máxima, el punto de rotura, la energía elástica, y la tenacidad.

(Características de deslizamiento (ensayo de indentación))

El ensayo de indentación, que mide las características de deslizamiento, se llevó a cabo mediante la determinación de la viscoelasticidad. Es posible observar un fenómeno donde aumenta la distorsión. Un instrumento, tal como una varilla o similar, se empuja en un material de gel, y la deformación del material se controla.

(Resultados)

Un tejido protésico puede desprenderse mucho más fácilmente cuando se añade ácido ascórbico 2-fosfato que en un sistema de cultivo sin ácidos ascórbico y en un sistema de cultivo que contiene ácido ascórbico 1-fosfato de uso habitual. Además, el tejido no se cultivó a un tamaño de varios milímetros en el sistema de cultivo sin ácidos ascórbicos. Si el tejido excede dicho tamaño, se producían grietas y el crecimiento se detuvo. El tamaño, la resistencia y similares son mayores en el sistema de cultivo con ácido ascórbico 2-fosfato que en el sistema de cultivo que contiene ácido ascórbico de uso habitual. En el sistema sin ácidos ascórbico, también fue sustancialmente difícil desprender el tejido. Por lo tanto, no se pudo proporcionar tejido protésico implantable.

Particularmente, el tejido protésico cultivado en el sistema que contiene ácido ascórbico 2-fosfato tenía una rigidez tal que se podía pinzar con pinzas. Los tejidos protésicos cultivados en otros sistemas tenían menos rigidez que el tejido protésico cultivado en el sistema que contiene ácido ascórbico 2-fosfato. El tejido protésico cultivado en medio que contiene ácido ascórbico 2-fosfato se cultivó hasta un tamaño implantable y fuera fácil de separar. Además, se aisló el tejido protésico, al tiempo que no se generó sustancialmente ningún agujero o cicatriz. La inspección de la conexión biológica demostró que la interacción mediada por la matriz extracelular fue significativa.

(Ejemplo 9 (Referencia): Efecto del tejido protésico cultivado en presencia de ácidos ascórbicos)

El tejido protésico producido en la presencia de ácidos ascórbicos en los Ejemplos 7 y 8 se implantó en hámsteres con miocardiopatía dilatada. Todos los ratones implantados se curaron y sobrevivieron tanto tiempo como los hámsteres normales. Por lo tanto, se demostró que la presente invención puede curar enfermedades, que se cree convencionalmente que son resistentes, proporcionando un agente estimulante tridimensional específico.

(Ejemplo 10 (Referencia): Terapia combinada)

Una terapia combinada de una lámina tal como se preparó en los ejemplos descritos anteriormente, y la terapia génica, se llevó a cabo. La terapia combinada tiene como objetivo estimular la angiogénesis en los sitios en los que se han implantado láminas, lo que estimula la aceptación de láminas implantadas y suprime la necrosis celular dentro de las láminas.

(Métodos)

Se preparó un complejo de virus Sendai (HVJ) y un liposoma de acuerdo con la descripción de un documento (Kaneda Y., Iwai K., Uchida T., Increased Expression of DNA Co-introduced with Nuclear Protein in Adult Rat Liver, Science, 1989, 243:375-378). En lo sucesivo en el presente documento se describirá brevemente este procedimiento. Se prepararon 200 µl de solución de ADN y se agitó durante 30 segundos. La solución se dejó en reposo en un baño de temperatura constante a 37 °C durante 30 segundos. Este procedimiento se realizó 8 veces. La solución se sometió a tratamiento ultrasónico durante 5 segundos y se agitó durante 30 segundos. Se añadieron 0,3 ml de BSS a la solución, seguido de agitación en un baño a temperatura constante a 37 °C. A la solución se añadió HVJ inactivado, a que a su vez se colocó en hielo durante 10 minutos. La solución se agitó en un baño de temperatura constante a 37 °C durante 1 hora. Se dispuso en capas 1 ml de la solución de sacarosa al 60 % y 6 ml de solución al 30 % de sacarosa en un tubo de ultracentrifugación. La solución de liposomas HVJ se colocó en la solución en capas. Al tubo se añadió BSS. El tubo se ultracentrifugó en 62, 800 x g 4 veces durante 1,5 horas. Una capa inmediatamente por encima de la capa de solución de sacarosa al 30 % se retiró y se conservó a 4 °C. Este liposoma se utilizó para la introducción de genes.

Se inyectaron aproximadamente 0,2 ml del complejo liposoma del virus Sendai-plásmido (que contiene 15 µg de ADNc de HGF humano) en una región de infarto de miocardio. En un grupo control, se usó un vector vacío para la introducción de genes en el miocardio infartado. La concentración de HGF humano de tejido cardíaco se midió mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando un anticuerpo monoclonal anti-HGF humano (Institute of Immunology, Tokio, Japón) (Ueda H., Sawa Y., Matsumoto K. et al., Gene Transfection of Hepatocyte Growth Factor Attenuates Reperfusion Injury in the Heart, Ann. Thorac. Surg., 1999, 67:1726-1731). Las

células resultantes se cultivaron en placas injertadas con una macromolécula respondedora a la temperatura hecha de poli (N-isopropilamida) y se desprendieron como una lámina de células cambiando la temperatura en lugar del tratamiento enzimático. Para los modelos de infarto de miocardio preparados mediante ligadura de la ADI, se realizaron tres tratamientos diferentes: 1) grupo de lámina de células; 2) grupo de terapia génica; 3) grupo de terapia combinada; y 4) grupo control. Para estos grupos, los cambios en la función cardíaca y el tejido miocárdico se examinaron.

(Resultados)

10 En el grupo con implantación de lámina de células y el en grupo de terapia combinada mejoraron las funciones cardíacas, es decir, la contractilidad y la extensibilidad. Además, se confirma que en el grupo de terapia combinada se observa angiogénesis y las células implantadas son aceptadas por la parte de infarto de miocardio.

(Conclusión)

15 Una combinación de tejido de lámina y terapia génica tiene un efecto de mejora de la función cardíaca, y un efecto de angiogénesis, y un efecto de protección celular. También se confirmó que la función cardíaca mejora adicionalmente.

## 20 **Aplicabilidad industrial**

La presente invención proporciona un método terapéutico radical, una técnica y un medicamento para enfermedades que son difíciles de tratar mediante las terapias convencionales (en particular, las enfermedades cardíacas que presentan insuficiencia cardíaca grave, etc.).

## 25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Cardio, Inc.

30 <120> Construcción tridimensional de tejido

<130> CD009PCT

35 <150> JP2003-285476

<151> 01-08-2003

<160> 20

40 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 5956

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

45 <400> 1

atgagttctg actcagaatt ggctgttttt gggaggctg ctcttttctt ccgaangtct 80  
 gaaagggaac gcattgagge ccagaatagg ccctttgatg ccaaaacatc tgtctttgig 120  
 gcggagcccc sagsatcctt tgtcaaggg accatccaga gcagagaagg aggaaaagtg 180  
 acggtgaaga ctgagggagg agcgactctg acagtgaagg atgatacaggt cttccccatg 240  
 aaccttccc aatatgacaa gatcgaggat atggccatga tgactcatct gcctgagcct 300  
 gctgtgctgt acaacctcaa agaacgttat gcagcctgga tgatctacac ctattcaggt 360  
 ctcttctgtg tcactgtcaa cccctacaag tggctgctg tgtataagcc cgaggtggtg 420  
 acagcctacc gaggcaaaaa gcgccaggag gccccgccc acatottctc catctctgac 480  
 aagcctatc agttcatgct gactgaccga gagaatcagt caatcctgat cactggagaa 540  
 tctggtgcag ggaagactgt gaacaccaag cgtgtcatcc agtactttgc aacaattgca 600  
 gttactggtg agaagaaga ggaagaatt acttctggca aaatacaggg gactctggaa 660  
 gatcaaatca tcagtccaa cccctactg gaggcotttg gcaacgocaa gaccgtgagg 720  
 aatgacaact cotctcgctt tggtaattc atcagaatcc actttggcac tactggaaaa 780  
 ctggcatctg ctgatattga aacatatctg ctagagaagt ctagagttgt ittccagctt 840

aaggctgaga gaagttatca ttttttttac cagattacat cgaataagaa accagaactt 900  
attgaaatgc ttctgattac cacgaaccca tatgattacc catttgcag tcaaggggag 960  
atcagtgtgg ccagcatcga tgatcaggaa gaactgatgg ccacagatag tgctattgat 1020  
attttgggct ttactaatga agaaaaggtc tocatttaca agctcacggg ggctgtgatg 1080  
cattatggga acctaaatt taagcaaaag cagcgtgagg agcaagcaga gccagatggc 1140  
acagaagttg ctgacaaggc ggcctacctc cagagtctga actctgcaga tcigtctaaa 1200  
gtctctgtct aocccagggt caaggtcggc aatgagtatg tcaccaagg ccagactgta 1260  
gaacaggtgt coaacgcagt aggtgctctg gccaaagccg tctacgagaa gatgttctg 1320  
tggatggtg cccgcataa ccagcagctg gacaccaagc agcccaggca gtacttcac 1380  
gggtcttgg acattgctg ttttgagatt tttgatttca acagcctgga gcagctgtgc 1440  
atcaattica ccaatgagaa actgcaacag ttttcaacc accaatggt ogtgctggag 1500  
caggaggagt acaagaagga aggcacagag tggacgttca tcgacttgg gatggacctg 1560  
gotgcctgca togagctcat cgagaagcct atgggcctct totccatct ggaagaggag 1620  
tgcatgttcc ctaaggcaco agaaocctcc ttaagaaca agcigtatga ccagcacctg 1680  
ggcaagtctg ccaacttcca gaagcccaag gtggtcaaa gcaaggccga ggcccactc 1740  
gctctgattc actatgctgg tgttgggac tacaacatta ctggctggct ggagaagaac 1800  
aaggaccccc tgaatgagac cgtggttggc ctgtaccaga agtctgcaat gaaaacteta 1860  
gctcagctct tototggggo tcaactgct gaaggagagg gagctggtg aggggcoaag 1920  
aaaggtggtg agaagaagg ctcttcttcc cagacgtgt ctgcccttt cagagagaat 1980  
ttgaacaagc tgatgaocaa cctcaggagt acccatctc actttgtgag gtgtatcacc 2040  
cccaatgaga caaaaactcc tgatgcatg gagcatgagc ttgtctcca ccagctgagg 2100  
tgtaaoggtg tgotggaagg catcgcacc igttagaag gatttccaag oagaatcctt 2160  
tatgcagact tcaaacagag atacaagta ttaaatgcaa gtgcaatccc tgaaggcaa 2220  
ttcattgata gcaagaaggc ctctgagaag ctcttgcac ccatcgacat tgaccacacc 2280

cagtataaat ttgggcacac caaggtcttt ttcaaaagctg gtctttctggg gctcctagag 2340  
 gagatgagag atgacaagct ggcccagctg attacccgaa cccaggccag gtgcagaggg 2400  
 ttcttggcaa gagtggagta ccagaggatg gtggagagaa gggaggccat ctctctgctc 2460  
 cagtacaata icagatcctt catgaaatgc aagcactggc cctggatgaa actcttcttc 2520  
 aagatcaagc ctctgttgaa gagtgcagaa actgagaagg agatggccac catgaaggaa 2580  
 gaatttcaga aaattaaga cgaacttggc aagtcagagg caaaaaggaa ggaactggaa 2640  
 gaaaagatgg tgacgctgtt gaaagaaaaa aatgacttgc agctccaagt tcaggotgaa 2700  
 gccgaaggct tggctgatgc agaggaagg tgtgaccagc taatcaaac caaatccag 2760  
 ctagaagcca aatcaaga ggtgactgag agagctgagg atgaggaaga gatcaatgct 2820  
 gagotgacag ccaagaagag gaaatggag gctgaatgtt cagaactcaa gaagacatt 2880  
 gatgacctg agctgacct ggccaaggtt gagaaggaga aacatgccac agaaaacaag 2940  
 gtgaaaaacc tcacagaaga gatggcaggt ctggatgaaa coattgctaa gctgaccaag 3000  
 gagaagaagg ctctccagaa ggcaccag cagacotggt atgacctga ggcagaggag 3060  
 gacaagctca acacctgac caagctaaa atcaacttg aacaacaagt ggatgatctt 3120  
 gaagggtcct tggagcaaga aaggaactt cgcctggacc tagaaagggc taagaggaaa 3180  
 ottgagggtg acttgaagt ggccaagaa tccataatg acattgaaa tgagaacag 3240  
 caacttgatg aaaagctcaa aagaaagag ttgaaatca gcaatctga aagcaagatt 3300  
 gaagatgaa aggcacttg cattonattg cagaagaaa ttaaagaatt gcaagccgc 3360  
 attgagagc tggaggagg aatcgaggcg gagcgggcct cccgggcaa agcagagaag 3420  
 cagcgtctg acctctccc ggagctgag gagatcagc agagctgga agaagccgt 3480  
 gggccactt cagcccagat tgagatgaa aagaagcgg aggotgatt ccgaaatg 3540  
 cgcaggacc tggaggagg caccctacag catgaagca cagcggccac cctgaggaag 3600  
 aagcatgag atagtgtgc cgagcttgg gagcagattg acaacctga gcgagtgaag 3660  
 cagaagctgg agaaggagaa gagtgagatg aagatggaga ttgatgacct tgctagtaat 3720

gtagaacgg tctccaaagc caagggaaac ctagagaaaa tgtccggac tctagaggac 3780  
 caactgagtg aactgaaatc aaaggaagag gaggcagcagc ggcctgatcaa tgacctgact 3840  
 gcgcagaggg ggcgcctgca gactgaatct ggtgagtttt cacgccagct tgatgaaaag 3900  
 gaagotctgg tgtctcagtt atcaagaggc aaacaagoc ttaotcaaca gattgaagaa 3960  
 ttaagagggc aacttgaaga gtagataaaa gcaagaacg ccctggcgca tgccctgcag 4020  
 tcttccggcc acgactgtga cctgctcggg gaacagtatg aggaggagca ggaatccaag 4080  
 gccgagctgc agagagcact gtccaaggcc aacaccgagg ttgcccaatg gaggaccaaa 4140  
 taagagcgg acgccatcca ggcacagag gagctggagg aggccaagaa gaagctggcc 4200  
 cagcggctgc aggcagctga ggaacatgta gaagctgtga acgccaatg tgcttcctc 4260  
 gaaaagacga agcagcggct gcagaatgag gtcgaggacc tcatgcttga tgtggagagg 4320  
 acaaatgcog cctgtgcgc ccttgacaaa aagcaagga aottcgataa gatootggca 4380  
 gaatggaac agaatgtga gaaacgcat gctgagcttg agcctccca gaaggaggcc 4440  
 cgttccttg gcactgagct gttcaagata aagaatgcct atgaggaatc tttggtcag 4500  
 ctagaaaccc tgaagcgaga gaaccaaac ttacagcagg agatttctga cctcacggaa 4560  
 cagattgcag aaggaggaa acgtatccat gaactggaga aaataaagaa acaagtggaa 4620  
 caagaaaagt gtgaacttca ggctgcttta gaagaagcag aggcattctt tgaacatgaa 4680  
 gagggaaga tctcgcgat ccagcttgag ttgaaccaag tcaagtctga ggttgatagg 4740  
 aaaattgctg aaaaagatga gaaattgac cagctgaaga gaanocacat tagaatcgtg 4800  
 gagtccatgc agagcaogct ggatgctgag atcaggagta ggaatgatgc cattaggctc 4860  
 aagaagaaga tgggggaga cctcaatgaa atggaatcc agctgaacca tgccaaccg 4920  
 atggctgctg aggcctgag gaactacagg aacaccaag gcatoctcaa ggataccag 4980  
 atccacctgg atgatgotct cggagocag gaggacctga agaaacagct ggccatggtg 5040  
 gaggcagag ccacctgct gcagctgag atcgaggagc tgcggccac tctggaacag 5100  
 acagagagga gcagaaaaat cgcagaacag gagctcctgg atgccagtga gcgtgttcag 5160

ctactgcaca cccagaacac cagcctgatc aacaccaaga agaagctgga gacagatatt 5220  
 tcccaaatgc aaggagagat ggaggacatt ctccaggaag cccgcaatgc agaagaaaag 5280  
 gccaaagaagg ccatcactga tgccgccatg atggctgagg agctgaagaa ggagcaggac 5340  
 accagcgcoc acctggagcg gatgaagaag aacatggagc agaccgtgaa gzatctgcag 5400  
 ctccgtctgg atgaggctga gcagctggcc ctgaagggtg ggaagaagca gatccagaaa 5460  
 ctggaggcca ggttacggga gctggaagga gaggttgaga gtgagcaaaa gcgtaatget 5520  
 gaggtctgta aaggtotgog caaacatgag aggcgagtga aggaactaac tiaccagacg 5580  
 gaagaagata gaagaatat tctcaggctt caagatttg tagataaact tcaggcaaaa 5640  
 gtgaaatctt ataagagaca agctgaggag gctgaggaac aatccaacac caatctagct 5700  
 aaattccgca agctccagca tgagctggag gaggccgagg aacgggctga cattgctgag 5760  
 tcccaagtga acaaaactgog gctgaagagc cgggaggttc acacaasagt cataagtga 5820  
 gagtatcat gtctgatgc catggaatga ctgaagacag gcacaaaatg tgacatcttt 5880  
 ggtcatttcc ctctgtaatt attgtgtatt ctacctgtt gcaaaaggaaa taagcatag 5940  
 ggtagtttgc aaacaa 5956

<210> 2  
 <211> 1941  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

Met Ser Ser Asp Ser Glu Leu Ala Val Phe Gly Glu Ala Ala Pro Phe  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Lys Ser Glu Arg Glu Arg Ile Glu Ala Gln Asn Arg Pro Phe  
 20 25 30  
 Asp Ala Lys Thr Ser Val Phe Val Ala Glu Pro Lys Glu Ser Phe Val  
 35 40 45

10

Lys Gly Thr Ile Gln Ser Arg Glu Gly Gly Lys Val Thr Val Lys Thr  
 50 55 60

Glu Gly Gly Ala Thr Leu Thr Val Lys Asp Asp Gln Val Phe Pro Met  
 65 70 75 80

Asn Pro Pro Lys Tyr Asp Lys Ile Glu Asp Met Ala Met Met Thr His  
 85 90 95

Leu His Glu Pro Ala Val Leu Tyr Asn Leu Lys Glu Arg Tyr Ala Ala  
 100 105 110

Trp Met Ile Tyr Thr Tyr Ser Gly Leu Phe Cys Val Thr Val Asn Pro  
 115 120 125

Tyr Lys Trp Leu Pro Val Tyr Lys Pro Glu Val Val Thr Ala Tyr Arg  
 130 135 140

Gly Lys Lys Arg Gln Glu Ala Pro Pro His Ile Phe Ser Ile Ser Asp  
 145 150 155 160

Asn Ala Tyr Gln Phe Met Leu Thr Asp Arg Glu Asn Gln Ser Ile Leu  
 165 170 175

Ile Thr Gly Glu Ser Gly Ala Gly Lys Thr Val Asn Thr Lys Arg Val  
 180 185 190

Ile Gln Tyr Phe Ala Thr Ile Ala Val Thr Gly Glu Lys Lys Lys Glu  
 195 200 205

Glu Ile Thr Ser Gly Lys Ile Gln Gly Thr Leu Glu Asp Gln Ile Ile  
 210 215 220

Ser Ala Asn Pro Leu Leu Glu Ala Phe Gly Asn Ala Lys Thr Val Arg  
 225 230 235 240

Asn Asp Asn Ser Ser Arg Phe Gly Lys Phe Ile Arg Ile His Phe Gly  
 245 250 255

Thr Thr Gly Lys Leu Ala Ser Ala Asp Ile Glu Thr Tyr Leu Leu Glu  
 260 265 270

Lys Ser Arg Val Val Phe Gln Leu Lys Ala Glu Arg Ser Tyr His Ile  
 275 280 285

Phe Tyr Gln Ile Thr Ser Asn Lys Lys Pro Glu Leu Ile Glu Met Leu  
 290 295 300

Leu Ile Thr Thr Asn Pro Tyr Asp Tyr Pro Phe Val Ser Gln Gly Glu  
 305 310 315 320

Ile Ser Val Ala Ser Ile Asp Asp Gln Glu Glu Leu Met Ala Thr Asp  
 325 330 335

Ser Ala Ile Asp Ile Leu Gly Phe Thr Asn Glu Glu Lys Val Ser Ile  
 340 345 350

Tyr Lys Leu Thr Gly Ala Val Met His Tyr Gly Asn Leu Lys Phe Lys  
 355 360 365

Gln Lys Gln Arg Glu Glu Gln Ala Glu Pro Asp Gly Thr Glu Val Ala  
 370 375 380

Asp Lys Ala Ala Tyr Leu Gln Ser Leu Asn Ser Ala Asp Leu Leu Lys  
 385 390 395 400

Ala Leu Cys Tyr Pro Arg Val Lys Val Gly Asn Glu Tyr Val Thr Lys  
 405 410 415

Gly Gln Thr Val Glu Gln Val Ser Asn Ala Val Gly Ala Leu Ala Lys  
 420 425 430

Ala Val Tyr Glu Lys Met Phe Leu Trp Met Val Ala Arg Ile Asn Gln  
 435 440 445

Gln Leu Asp Thr Lys Gln Pro Arg Gln Tyr Phe Ile Gly Val Leu Asp  
 450 455 460

Ile Ala Gly Phe Glu Ile Phe Asp Phe Asn Ser Leu Glu Gln Leu Cys  
 465 470 475 480

Ile Asn Phe Thr Asn Glu Lys Leu Gln Gln Phe Phe Asn His His Met  
 485 490 495

Phe Val Leu Glu Gln Glu Tyr Lys Lys Glu Gly Ile Glu Trp Thr  
 500 505 510

Phe Ile Asp Phe Gly Met Asp Leu Ala Ala Cys Ile Glu Leu Ile Glu  
 515 520 525

Lys Pro Met Gly Ile Phe Ser Ile Leu Glu Glu Glu Cys Met Phe Pro  
 530 535 540

Lys Ala Thr Asp Thr Ser Phe Lys Asn Lys Leu Tyr Asp Gln His Leu  
 545 550 555 560

Gly Lys Ser Ala Asn Phe Gln Lys Pro Lys Val Val Lys Gly Lys Ala  
 565 570 575

Glu Ala His Phe Ala Leu Ile His Tyr Ala Gly Val Val Asp Tyr Asn  
 580 585 590

Ile Thr Gly Trp Leu Glu Lys Asn Lys Asp Pro Leu Asn Glu Thr Val  
 595 600 605

Val Gly Leu Tyr Gln Lys Ser Ala Met Lys Thr Leu Ala Gln Leu Phe  
 610 615 620



Ile Phe Cys Ile Gln Tyr Asn Ile Arg Ser Phe Met Asn Val Lys His  
 820 825 830

Trp Pro Trp Met Lys Leu Phe Phe Lys Ile Lys Pro Leu Leu Lys Ser  
 835 840 845

Ala Glu Thr Glu Lys Glu Met Ala Thr Met Lys Glu Glu Phe Gln Lys  
 850 855 860

Ile Lys Asp Glu Leu Ala Lys Ser Glu Ala Lys Arg Lys Glu Leu Glu  
 865 870 875 880

Glu Lys Met Val Thr Leu Leu Lys Glu Lys Asn Asp Leu Gln Leu Gln  
 885 890 895

Val Gln Ala Glu Ala Glu Gly Leu Ala Asp Ala Glu Glu Arg Cys Asp  
 900 905 910

Gln Leu Ile Lys Thr Lys Ile Gln Leu Glu Ala Lys Ile Lys Glu Val  
 915 920 925

Thr Glu Arg Ala Glu Asp Glu Glu Glu Ile Asn Ala Glu Leu Thr Ala  
 930 935 940

Lys Lys Arg Lys Leu Glu Asp Glu Cys Ser Glu Leu Lys Lys Asp Ile  
 945 950 955 960

Asp Asp Leu Glu Leu Thr Leu Ala Lys Val Glu Lys Glu Lys His Ala  
 965 970 975

Thr Glu Asn Lys Val Lys Asn Leu Thr Glu Glu Met Ala Gly Leu Asp  
 980 985 990

Glu Thr Ile Ala Lys Leu Thr Lys Glu Lys Lys Ala Leu Gln Glu Ala  
 995 1000 1005

His Gln Gln Thr Leu Asp Asp Leu Gln Ala Glu Glu Asp Lys Val  
 1010 1015 1020

Asn Thr Leu Thr Lys Ala Lys Ile Lys Leu Glu Gln Gln Val Asp  
 1025 1030 1035

Asp Leu Glu Gly Ser Leu Glu Gln Glu Lys Lys Leu Arg Met Asp  
 1040 1045 1050

Leu Glu Arg Ala Lys Arg Lys Leu Glu Gly Asp Leu Lys Leu Ala  
 1055 1060 1065

Gln Glu Ser Ile Met Asp Ile Glu Asn Glu Lys Gln Gln Leu Asp  
 1070 1075 1080

Glu Lys Leu Lys Lys Lys Glu Phe Glu Ile Ser Asn Leu Gln Ser  
 1085 1090 1095

Lys Ile Glu Asp Glu Gln Ala Leu Gly Ile Gln Leu Gln Lys Lys  
 1100 1105 1110

Ile Lys Glu Leu Gln Ala Arg Ile Glu Glu Leu Glu Glu Glu Ile  
 1115 1120 1125

Glu Ala Glu Arg Ala Ser Arg Ala Lys Ala Glu Lys Gln Arg Ser  
 1130 1135 1140

Asp Leu Ser Arg Glu Leu Glu Glu Ile Ser Glu Arg Leu Glu Glu  
 1145 1150 1155

Ala Gly Gly Ala Thr Ser Ala Gln Ile Glu Met Asn Lys Lys Arg  
 1160 1165 1170

Glu Ala Glu Phe Gln Lys Met Arg Arg Asp Leu Glu Glu Ala Thr  
 1175 1180 1185

Leu Gln His Glu Ala Thr Ala Ala Thr Leu Arg Lys Lys His Ala  
 1190 1195 1200

Asp Ser Val Ala Glu Leu Gly Glu Gln Ile Asp Asn Leu Gln Arg  
 1205 1210 1215

Val Lys Gln Lys Leu Glu Lys Glu Lys Ser Glu Met Lys Met Glu  
 1220 1225 1230

Ile Asp Asp Leu Ala Ser Asn Val Glu Thr Val Ser Lys Ala Lys  
 1235 1240 1245

Gly Asn Leu Glu Lys Met Cys Arg Thr Leu Glu Asp Gln Leu Ser  
 1250 1255 1260

Glu Leu Lys Ser Lys Glu Glu Glu Gln Gln Arg Leu Ile Asn Asp  
 1265 1270 1275

Leu Thr Ala Gln Arg Gly Arg Leu Gln Thr Glu Ser Gly Glu Phe  
 1280 1285 1290

Ser Arg Gln Leu Asp Glu Lys Glu Ala Leu Val Ser Gln Leu Ser  
 1295 1300 1305

Arg Gly Lys Gln Ala Phe Thr Gln Gln Ile Glu Glu Leu Lys Arg  
 1310 1315 1320

Gln Leu Glu Glu Glu Ile Lys Ala Lys Asn Ala Leu Ala His Ala  
 1325 1330 1335

Leu Gln Ser Ser Arg His Asp Cys Asp Leu Leu Arg Glu Gln Tyr  
 1340 1345 1350

Glu Glu Glu Gln Glu Ser Lys Ala Glu Leu Gln Arg Ala Leu Ser  
 1355 1360 1365

Lys Ala Asn Thr Glu Val Ala Gln Trp Arg Thr Lys Tyr Glu Thr  
 1370 1375 1380

Asp Ala Ile Gln Arg Thr Glu Glu Leu Glu Glu Ala Lys Lys Lys  
 1385 1390 1395

Leu Ala Gln Arg Leu Gln Ala Ala Glu Glu His Val Glu Ala Val  
 1400 1405 1410

Asn Ala Lys Cys Ala Ser Leu Glu Lys Thr Lys Gln Arg Leu Gln  
 1415 1420 1425

Asn Glu Val Glu Asp Leu Met Leu Asp Val Glu Arg Thr Asn Ala  
 1430 1435 1440

Ala Cys Ala Ala Leu Asp Lys Lys Gln Arg Asn Phe Asp Lys Ile  
 1445 1450 1455

Leu Ala Glu Trp Lys Gln Lys Cys Glu Glu Thr His Ala Glu Leu  
 1460 1465 1470

Glu Ala Ser Gln Lys Glu Ala Arg Ser Leu Gly Thr Glu Leu Phe  
 1475 1480 1485

Lys Ile Lys Asn Ala Tyr Glu Glu Ser Leu Asp Gln Leu Glu Thr  
 1490 1495 1500

Leu Lys Arg Glu Asn Lys Asn Leu Gln Gln Glu Ile Ser Asp Leu  
 1505 1510 1515

Thr Glu Gln Ile Ala Glu Gly Gly Lys Arg Ile His Glu Leu Glu  
 1520 1525 1530

Lys Ile Lys Lys Gln Val Glu Gln Glu Lys Cys Glu Leu Gln Ala  
 1535 1540 1545

Ala Leu Glu Glu Ala Glu Ala Ser Leu Glu His Glu Glu Gly Lys  
 1550 1555 1560

Ile Leu Arg Ile Gln Leu Glu Leu Asn Gln Val Lys Ser Glu Val  
 1565 1570 1575

Asp Arg Lys Ile Ala Glu Lys Asp Glu Glu Ile Asp Gln Leu Lys  
 1580 1585 1590

Arg Asn His Ile Arg Ile Val Glu Ser Met Gln Ser Thr Leu Asp  
 1595 1600 1605

Ala Glu Ile Arg Ser Arg Asn Asp Ala Ile Arg Leu Lys Lys Lys  
 1610 1615 1620

Met Glu Gly Asp Leu Asn Glu Met Glu Ile Gln Leu Asn His Ala  
 1625 1630 1635

Asn Arg Met Ala Ala Glu Ala Leu Arg Asn Tyr Arg Asn Thr Gln  
 1640 1645 1650

Gly Ile Leu Lys Asp Thr Gln Ile His Leu Asp Asp Ala Leu Arg  
 1655 1660 1665

Ser Gln Glu Asp Leu Lys Glu Gln Leu Ala Met Val Glu Arg Arg  
 1670 1675 1680

Ala Asn Leu Leu Gln Ala Glu Ile Glu Glu Leu Arg Ala Thr Leu  
 1685 1690 1695

Glu Gln Thr Glu Arg Ser Arg Lys Ile Ala Glu Gln Glu Leu Leu  
 1700 1705 1710

Asp Ala Ser Glu Arg Val Gln Leu Leu His Thr Gln Asn Thr Ser  
 1715 1720 1725

Leu Ile Asn Thr Lys Lys Lys Leu Glu Thr Asp Ile Ser Gln Met  
 1730 1735 1740

Gln Gly Glu Met Glu Asp Ile Leu Gln Glu Ala Arg Asn Ala Glu  
 1745 1750 1755

Glu Lys Ala Lys Lys Ala Ile Thr Asp Ala Ala Met Met Ala Glu  
 1760 1765 1770

Glu Leu Lys Lys Glu Gln Asp Thr Ser Ala His Leu Glu Arg Met  
 1775 1780 1785

Lys Lys Asn Met Glu Gln Thr Val Lys Asp Leu Gln Leu Arg Leu  
 1790 1795 1800

Asp Glu Ala Glu Gln Leu Ala Leu Lys Gly Gly Lys Lys Gln Ile  
 1805 1810 1815

Gln Lys Leu Glu Ala Arg Val Arg Glu Leu Glu Gly Glu Val Glu  
 1820 1825 1830

Ser Glu Gln Lys Arg Asn Ala Glu Ala Val Lys Gly Leu Arg Lys  
 1835 1840 1845

His Glu Arg Arg Val Lys Glu Leu Thr Tyr Gln Thr Glu Glu Asp  
 1850 1855 1860

Arg Lys Asn Ile Leu Arg Leu Gln Asp Leu Val Asp Lys Leu Gln  
 1865 1870 1875

Ala Lys Val Lys Ser Tyr Lys Arg Gln Ala Glu Glu Ala Glu Glu  
 1880 1885 1890

Gln Ser Asn Thr Asn Leu Ala Lys Phe Arg Lys Leu Gln His Glu  
 1895 1900 1905

Leu Glu Glu Ala Glu Glu Arg Ala Asp Ile Ala Glu Ser Gln Val  
 1910 1915 1920

Asn Lys Leu Arg Val Lys Ser Arg Glu Val His Thr Lys Val Ile  
 1925 1930 1935

Ser Glu Glu  
 1940

5 <210> 3  
 <211> 6016  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 3

atccttctc aaaattcttg aagtagttgt ctgctttgag cctgccacct tottcatctg 60  
 ataatacaag aggtatacct agtccagcac tgccatcaat aacctgcago catgagttct 120  
 gactctgaga tggccatttt tggggaggct gctcctttcc tccgaaagtc tgaaaaggag 180  
 cgaattgaag ctcagaacaa gccttttgat gccaaagacat cagtctttgt ggtggacct 240  
 aaggagtctt acgtgaagc aatagtcag agcagggag ggggaaagt gacagccaag 300  
 accgaagctg gagctactgt aactgtgaaa gaagaccaag tcttctccat gaacctccc 360  
 aatctgaca agatcgagga catggccatg atgactcacc tgcattgagc tgctgtgctg 420  
 tataacctca aagagogta cgcagcctgg atgatctaca cctactcggg cctcttctgt 480  
 gtcaccgtca acctctaaa gtggctgccg gtgtacaacc ctgaggtggt gacagcotac 540  
 cgaggcaaaa agcggcagga ggccccacc catatcttct ccatctctga caatgoclat 600  
 cagttcatgc taactgatcg tgaaaaccag tcaatcttga ttaactggaga atctggtgca 660  
 ggaagactg tgaacacgaa gcgtgtcacc cagtactttg caacaattgc agttactgga 720  
 gagaagaaaa aagaggaacc tgcctctggc aaaatgcagg ggaccttga agatcaatc 780  
 atcagtgcta acctctact ggaagccttc ggaatgcca agacctgag gaatgacaac 840  
 tctctctgt ttgtaaat catcaggatc cattttggtg ccacaggcaa actggcttct 900

10

gcagatattg aaacatatct gctagagaa g tcccgagtta ctttccagct aaaggetgaa 960  
 agaagctacc acatatttta tcaaatctctg tccaataaga aaccagagct cattgaaatg 1020  
 cttctgatca ccaccaaccc atatgacttc gcatttgica gccaaagggga aattactgtg 1080  
 cccagcattg atgaccagga agagctgatg gccacagata gtgctgtgga catcctgggt 1140  
 ttcactgctg atgaaaaggt ggccatttac aagctcactg gagccgtgat gcattatggg 1200  
 aacatgaaat tcaagcaaaa gcaaagggaa gagcaggcag agccagatgg cacggaagtt 1260  
 gctgacaaag ctgottatct gacaagtctg aactctgctg acctgctcaa atctctctgc 1320  
 tatccagag tcaaggctcg caatgagttc gtaaccaag gccagactgt gcagcaggtg 1380  
 tacaacgcag tgggtgctct ggccaagcc atctacgaga agatgttctt gtggatggtc 1440  
 acccgcatca accagcagct ggacaccaag cagcccaggc agtacttcat cggggtcttg 1500  
 gacattgctg gctttgagat ctttgatttc aacagootgg agcagctgtg catcaacttc 1560  
 accaacgaga aactgcaaca gttttcaac caccacatgt tctgtctgga gcaggaagag 1620  
 tacaagaagg aaggcatcga gtggagttc attgacttcg gatggacct gctgcctgc 1680  
 atcgagotoa tggagaagoo tatgggcato tctccatcc tagaagagga gtgcattgto 1740  
 cccaaggcaa cagacacctc cttcaaganc aagctgtatg aacaacatct tggaaaatcc 1800  
 aacaacttcc agaagcccaa gctgccaas ggcaagcctg aggctcactt ctcaactggtg 1860  
 cactatgccg gcaccgtgga ctacaacatc gccggctggc tggacaabaa caaggacccc 1920  
 ctgaatgaga ctgtgggtgg gctgtaccag aagctctgaa tgaagactct gcttttctc 1980  
 ttctotgggg cacaactgc tgaagcagag gttggtgtg gaaagaaagg tggcaaaaag 2040  
 aagggttctt ctttcagao agtctcagct cttttcaggg agaattttaa taagctgatg 2100  
 accaacttga ggagcactca cccccactt gtgcgggtgca tcatcccaa tgaactaaa 2160  
 actcctgggtg ccatggagca tgagcttgtc ctgcatcagc tgaggtgtaa cgtgtgctg 2220  
 gaaggcatcc gcatctgcag gaaaggotto ccaagcagaa tccctttatgc agacttcaaa 2280  
 cagagataca agtttctaaa tgcaggtgct atcccagagg gtcagttcat tgacagcaag 2340

aaggctctg agaaacttct agggctctatt gaaattgacc acaccocagta caaattcoggt 2400  
 cataccaagg ttttcttcaa agctggcctg ctgggaactc tagaagaaat gcgagatgaa 2460  
 aagctagctc aactcatcac gcgcactcaa gccatattgca gggggttcct gatgagagtg 2520  
 gatttcagaa agatgatgga gaggagagag tccatcttct gcattcagta caacatcogt 2580  
 gctttcatga atgigaagca ctggccctgg atgaagctgt atttcaagat caagccoctc 2640  
 ctcaagagtg cagagacaga gaaggagatg gccaacatga aggaagaatt tgagaaaacc 2700  
 aaagaagagc tggctcagac agaggcaaaa aggaagaagc tagaagaaaa gatggtgacg 2760  
 ctatgcaag agaaaaatga cttacaactc caagttcaag ctgaagcaga tgcottggct 2820  
 gatgcagagg aaagatgta tcagttgatt aaaaccaaaa tccaacttga gcccaaaatc 2880  
 aaagaggtaa ctgaagagc tgaggatgag gaagagatca atgctgagct gacagccaag 2940  
 aagaggaaa caggagatga atgttcagag ctcaagaaag acattgatga cottgagctg 3000  
 aacttgcca agtttgaaa gagaacaat gccacagaga acaaggtgaa aaacctcaca 3060  
 gaagagatgg caggtctgga tgaaccatt gctaagctga ccaaggagaa gaaggctctc 3120  
 caggaggccc accagcagac cctggatgac ctgcagatgg aggaggacaa agtcaacacc 3180  
 ctgaccaag ctaaaaccas gctagaacag caagtggacg atcttgaagg atctctggaa 3240  
 caagaaaaga aactttgcat ggacttagaa agagccaaga gaaaactgga gggtagcota 3300  
 aaattggccc aagaatccac aatggataca gaaatgaca aacagcaact taatgagaaa 3360  
 ctcaaaaaga aagagttga aatgagcaat ctgcaaggca agattgaga tgaacaagcc 3420  
 ottgcaatgc agctacaaa gaagatcaaa gaattacagg cccgcattga ggagctggag 3480  
 gaggaaatcg aggcagagcg ggcctccgg gccaaagcag aaaagcagcg ctctgacctc 3540  
 tcccgggagc tggaggagat cagttagagg ctggaagaag ccggtggggc cacttcagcc 3600  
 oagattgagt tgaaoagaa gcgggaggct gatttcaga aaatgcgag ggcctggaa 3660  
 gagtccacc tgcagcacga agccacggca gctgctcttc ggaagagca cgcagatagt 3720  
 gtggctgagc ttgggaagca gatcgacagc cttcagcggg tcaagcagaa gctggagaag 3780

gaaaagagtg agctgaagat ggagatcaat gaccttgcta gtaacatgga gactgtctcc 3840  
 aaagccaagg caaactttga gaaatgtgc cgcaccctag aggaccagct tagtgaata 3900  
 aaaacaaagg aagaagagca gcaacgctta ataatgagt tgcagccca gaaggcacgt 3960  
 ttacacacag aatcaggatga gttttcacga cagctagatg aaaaagatgc tatggtttct 4020  
 cagctatccc gaggcaaca gcatttaca caacagattg aagaattaa gaggcagcta 4080  
 gaagaggaga ctaaggccaa gagcactctg gcccatgccc tgcagtcagc ccgccatgac 4140  
 tgtgacctgc tgcgggaaca gtatgaggag gagcaggaag ccaaggctga gctgcagagg 4200  
 gaaatgtcca aggccaacag tgaggttccc cagtggagga ccaagtacga gacggacgcc 4260  
 atccagcgca cagaggagct ggaggagcc aagaagaagc tagcccagcg totgcaggat 4320  
 gcagaagaac atgtagaagc tgtgaattcc aatgtgctt ctcttgaana gacaagcag 4380  
 aggctacaga atgaagtaga ggacctcatg attgatgtgg aacgatctaa tgcigcctgc 4440  
 atagctctcg ataagaagca aagaacttt gacaaggte tggcagaatg gaaacagaag 4500  
 tatgaggaaa ctcaggctga acttgaggcc tcccagaagg agtcgcgttc tctcagcact 4560  
 gagctgttca agtgaagaa tgctacagag gaatccctgg atcatcttga aactctaaag 4620  
 cgagagaata agaecttaca acaggagatt tctgcctga cagagcaat tgcagagggt 4680  
 gaaagcata tccatgaact ggagasagta aagaacaac ttgatcatga gaagagtga 4740  
 ctacagaact ccctagagga agcagaggca tctcttgagc atgaagaagg caaattctt 4800  
 cgcattcaac ttgagctaaa tcaggtgaaa tctgagattg accgaaaaat tgctgaaaa 4860  
 gatgaagaac tcgatcagct aagaggaac catctcagag ttgtggagtc aatgcagagt 4920  
 acactggatg ctgagatcag gagcagaaat gatgctctga ggatcaagaa gaagatggag 4980  
 ggagatotta atgaatgga aatccagctg aaccatgcca accgccagc tgctgaggca 5040  
 ctaaggaatc ttagaaacac acaaggaata ctgaaggaca ctcagctaca ttggatgat 5100  
 gccatcagag gccaaatga ccttaaggaa caattggca tggttgagc cagagctaac 5160  
 ctgatgcagg ctgagttga agagctcagg gcctccctgg aacggactga gagaggcagg 5220

aaaatggcag agcaagagct tctggatgcc agtgaacgtg tgcaacttct gcacactcag 5280  
 aacaccagcc tgatcaacac caagangaag ctggaacag acatttccca aatccagga 5340  
 gagatggagg acatcgtcca ggaagcccgc aatgcagagg agaaggccaa gaaggccatc 5400  
 actgatgctg ccatgatggc tgaggagctg aagaaggaac aggacaccag cgcccacctg 5460  
 gagcagatga agaagaacct ggagcagacc gtgaaggatc tgcagctccg tctgggtgag 5520  
 gctgagcagc tggcgtgaa ggttgggaag aagcagatcc agaaactgga ggcagagtg 5580  
 agagagcttg aaagtgaggt ggaagtga cagaagcaca atgttgaggc tgtcaagggt 5640  
 cttgcasac atgagagaag agtgaaggaa ctcaactacc agactgagga ggaccgcaag 5700  
 satattctca ggctgcagga cttggtggac aaattgcaa ccaagtcaa agcttacaag 5760  
 agacaagctg aagaggetga ggaacaatcc aatgtcaacc ttgccasgtt ccgcaagctc 5820  
 cagcaogagc tggaggaggc cgaggaacgg gctgacattg ctgagtccca agtcaacaag 5880  
 ctgagagtga agagtcgga gttcacaca aaagtcataa gtgaagagta attcattcta 5940  
 atgaaagaa atgtgaccas agaantgcac gaaatgtgaa gttctttgtc actgtcctgt 6000  
 atatcaagga aatgaa 6016

<210> 4  
 <211> 1939  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 4

Met Ser Ser Asp Ser Glu Met Ala Ile Phe Gly Glu Ala Ala Pro Phe  
 1 5 10 15

Leu Arg Lys Ser Glu Lys Glu Arg Ile Glu Ala Gln Asn Lys Pro Phe  
 20 25 30

Asp Ala Lys Thr Ser Val Phe Val Val Asp Pro Lys Glu Ser Tyr Val  
 35 40 45

10

Lys Ala Ile Val Gln Ser Arg Glu Gly Gly Lys Val Thr Ala Lys Thr  
 50 55 60

Glu Ala Gly Ala Thr Val Thr Val Lys Glu Asp Gln Val Phe Ser Met  
 65 70 75 80

Asn Pro Pro Lys Tyr Asp Lys Ile Glu Asp Met Ala Met Met Thr His  
 85 90 95

Leu His Glu Pro Ala Val Leu Tyr Asn Leu Lys Glu Arg Tyr Ala Ala  
 100 105 110

Trp Met Ile Tyr Thr Tyr Ser Gly Leu Phe Cys Val Thr Val Asn Pro  
 115 120 125

Tyr Lys Trp Leu Pro Val Tyr Asn Pro Glu Val Val Thr Ala Tyr Arg  
 130 135 140

Gly Lys Lys Arg Gln Glu Ala Pro Pro His Ile Phe Ser Ile Ser Asp  
 145 150 155 160

Asn Ala Tyr Gln Phe Met Leu Thr Asp Arg Glu Asn Gln Ser Ile Leu  
 165 170 175

Ile Thr Gly Glu Ser Gly Ala Gly Lys Thr Val Asn Thr Lys Arg Val  
 180 185 190

Ile Gln Tyr Phe Ala Thr Ile Ala Val Thr Gly Glu Lys Lys Lys Glu  
 195 200 205

Glu Pro Ala Ser Gly Lys Met Gln Gly Thr Leu Glu Asp Gln Ile Ile  
 210 215 220

Ser Ala Asn Pro Leu Leu Glu Ala Phe Gly Asn Ala Lys Thr Val Arg  
 225 230 235 240

Asn Asp Asn Ser Ser Arg Phe Gly Lys Phe Ile Arg Ile His Phe Gly  
 245 250 255

Ala Thr Gly Lys Leu Ala Ser Ala Asp Ile Glu Thr Tyr Leu Leu Glu  
 260 265 270

Lys Ser Arg Val Thr Phe Gln Leu Lys Ala Glu Arg Ser Tyr His Ile  
 275 280 285

Phe Tyr Gln Ile Leu Ser Asn Lys Lys Pro Glu Leu Ile Glu Met Leu  
 290 295 300

Leu Ile Thr Thr Asn Pro Tyr Asp Phe Ala Phe Val Ser Gln Gly Glu  
 305 310 315 320

Ile Thr Val Pro Ser Ile Asp Asp Gln Glu Glu Leu Met Ala Thr Asp  
 325 330 335

Ser Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Thr Ala Asp Glu Lys Val Ala Ile  
 340 345 350

Tyr Lys Leu Thr Gly Ala Val Met His Tyr Gly Asn Met Lys Phe Lys  
 355 360 365

Gln Lys Gln Arg Glu Glu Gln Ala Glu Pro Asp Gly Thr Glu Val Ala  
 370 375 380

Asp Lys Ala Ala Tyr Leu Thr Ser Leu Asn Ser Ala Asp Leu Leu Lys  
 385 390 395 400

Ser Leu Cys Tyr Pro Arg Val Lys Val Gly Asn Glu Phe Val Thr Lys  
 405 410 415

Gly Gln Thr Val Gln Gln Val Tyr Asn Ala Val Gly Ala Leu Ala Lys  
 420 425 430

Ala Ile Tyr Glu Lys Met Phe Leu Trp Met Val Thr Arg Ile Asn Gln  
 435 440 445

Gln Leu Asp Thr Lys Gln Pro Arg Gln Tyr Phe Ile Gly Val Leu Asp  
 450 455 460

Ile Ala Gly Phe Glu Ile Phe Asp Phe Asn Ser Leu Glu Gln Leu Cys  
 465 470 475 480

Ile Asn Phe Thr Asn Glu Lys Leu Gln Gln Phe Phe Asn His His Met  
 485 490 495

Phe Val Leu Glu Gln Glu Tyr Lys Lys Glu Gly Ile Glu Trp Glu  
 500 505 510

Phe Ile Asp Phe Gly Met Asp Leu Ala Ala Cys Ile Glu Leu Ile Glu  
 515 520 525

Lys Pro Met Gly Ile Phe Ser Ile Leu Glu Glu Glu Cys Met Phe Pro  
 530 535 540

Lys Ala Thr Asp Thr Ser Phe Lys Asn Lys Leu Tyr Glu Gln His Leu  
 545 550 555 560

Gly Lys Ser Asn Asn Phe Gln Lys Pro Lys Pro Ala Lys Gly Lys Pro  
 565 570 575

Glu Ala His Phe Ser Leu Val His Tyr Ala Gly Thr Val Asp Tyr Asn  
 580 585 590

Ile Ala Gly Trp Leu Asp Lys Asn Lys Asp Pro Leu Asn Glu Thr Val  
 595 600 605

Val Gly Leu Tyr Gln Lys Ser Ala Met Lys Thr Leu Ala Phe Leu Phe  
 610 615 620

Ser Gly Ala Gln Thr Ala Glu Ala Glu Gly Gly Gly Gly Lys Lys Gly  
 625 630 635 640

Gly Lys Lys Lys Gly Ser Ser Phe Gln Thr Val Ser Ala Leu Phe Arg  
 645 650 655

Glu Asn Leu Asn Lys Leu Met Thr Asn Leu Arg Ser Thr His Pro His  
 660 665 670

Phe Val Arg Cys Ile Ile Pro Asn Glu Thr Lys Thr Pro Gly Ala Met  
 675 680 685

Glu His Glu Leu Val Leu His Gln Leu Arg Cys Asn Gly Val Leu Glu  
 690 695 700

Gly Ile Arg Ile Cys Arg Lys Gly Phe Pro Ser Arg Ile Leu Tyr Ala  
 705 710 715 720

Asp Phe Lys Gln Arg Tyr Lys Val Leu Asn Ala Ser Ala Ile Pro Glu  
 725 730 735

Gly Gln Phe Ile Asp Ser Lys Lys Ala Ser Glu Lys Leu Leu Gly Ser  
 740 745 750

Ile Glu Ile Asp His Thr Gln Tyr Lys Phe Gly His Thr Lys Val Phe  
 755 760 765

Phe Lys Ala Gly Leu Leu Gly Thr Leu Glu Glu Met Arg Asp Glu Lys  
 770 775 780

Leu Ala Gln Leu Ile Thr Arg Thr Gln Ala Ile Cys Arg Gly Phe Leu  
 785 790 795 800

Met Arg Val Glu Phe Arg Lys Met Met Glu Arg Arg Glu Ser Ile Phe  
 805 810 815

Cys Ile Gln Tyr Asn Ile Arg Ala Phe Met Asn Val Lys His Trp Pro  
 820 825 830

Trp Met Lys Leu Tyr Phe Lys Ile Lys Pro Leu Leu Lys Ser Ala Glu  
 835 840 845

Thr Glu Lys Glu Met Ala Asn Met Lys Glu Glu Phe Glu Lys Thr Lys  
 850 855 860

Glu Glu Leu Ala Lys Thr Glu Ala Lys Arg Lys Glu Leu Glu Glu Lys  
 865 870 875 880

Met Val Thr Leu Met Gln Glu Lys Asn Asp Leu Gln Leu Gln Val Gln  
 885 890 895

Ala Glu Ala Asp Ala Leu Ala Asp Ala Glu Glu Arg Cys Asp Gln Leu  
 900 905 910

Ile Lys Thr Lys Ile Gln Leu Glu Ala Lys Ile Lys Glu Val Thr Glu  
 915 920 925

Arg Ala Glu Asp Glu Glu Glu Ile Asn Ala Glu Leu Thr Ala Lys Lys  
 930 935 940

Arg Lys Leu Glu Asp Glu Cys Ser Glu Leu Lys Lys Asp Ile Asp Asp  
 945 950 955 960

Leu Glu Leu Thr Leu Ala Lys Val Glu Lys Glu Lys His Ala Thr Glu  
 965 970 975

Asn Lys Val Lys Asn Leu Thr Glu Glu Met Ala Gly Leu Asp Glu Thr  
 980 985 990

Ile Ala Lys Leu Thr Lys Glu Lys Lys Ala Leu Gln Glu Ala His Gln  
 995 1000 1005

Gln Thr Leu Asp Asp Leu Gln Met Glu Glu Asp Lys Val Asn Thr  
 1010 1015 1020

Leu Thr Lys Ala Lys Thr Lys Leu Glu Gln Gln Val Asp Asp Leu  
 1025 1030 1035

Glu Gly Ser Leu Glu Gln Glu Lys Lys Leu Cys Met Asp Leu Glu  
 1040 1045 1050

Arg Ala Lys Arg Lys Leu Glu Gly Asp Leu Lys Leu Ala Gln Glu  
 1055 1060 1065

Ser Thr Met Asp Thr Glu Asn Asp Lys Gln Gln Leu Asn Glu Lys  
 1070 1075 1080

Leu Lys Lys Lys Glu Phe Glu Met Ser Asn Leu Gln Gly Lys Ile  
 1085 1090 1095

Glu Asp Glu Gln Ala Leu Ala Met Gln Leu Gln Lys Lys Ile Lys  
 1100 1105 1110

Glu Leu Gln Ala Arg Ile Glu Glu Leu Glu Glu Glu Ile Glu Ala  
 1115 1120 1125

Glu Arg Ala Ser Arg Ala Lys Ala Glu Lys Gln Arg Ser Asp Leu  
 1130 1135 1140

Ser Arg Glu Leu Glu Glu Ile Ser Glu Arg Leu Glu Glu Ala Gly  
 1145 1150 1155

Gly Ala Thr Ser Ala Gln Ile Glu Leu Asn Lys Lys Arg Glu Ala  
 1160 1165 1170

Glu Phe Gln Lys Met Arg Arg Asp Leu Glu Glu Ser Thr Leu Gln  
 1175 1180 1185

His Glu Ala Thr Ala Ala Ala Leu Arg Lys Lys His Ala Asp Ser  
 1190 1195 1200

Val Ala Glu Leu Gly Lys Gln Ile Asp Ser Leu Gln Arg Val Lys  
 1205 1210 1215

Gln Lys Leu Glu Lys Glu Lys Ser Glu Leu Lys Met Glu Ile Asn  
 1220 1225 1230

Asp Leu Ala Ser Asn Met Glu Thr Val Ser Lys Ala Lys Ala Asn  
 1235 1240 1245

Phe Glu Lys Met Cys Arg Thr Leu Glu Asp Gln Leu Ser Glu Ile  
 1250 1255 1260

Lys Thr Lys Glu Glu Glu Gln Gln Arg Leu Ile Asn Glu Leu Ser  
 1265 1270 1275

Ala Gln Lys Ala Arg Leu His Thr Glu Ser Gly Glu Phe Ser Arg  
 1280 1285 1290

Gln Leu Asp Glu Lys Asp Ala Met Val Ser Gln Leu Ser Arg Gly  
 1295 1300 1305

Lys Gln Ala Phe Thr Gln Gln Ile Glu Glu Leu Lys Arg Gln Leu  
 1310 1315 1320

Glu Glu Glu Thr Lys Ala Lys Ser Thr Leu Ala His Ala Leu Gln  
 1325 1330 1335

Ser Ala Arg His Asp Cys Asp Leu Leu Arg Glu Gln Tyr Glu Glu  
 1340 1345 1350

Glu Gln Glu Ala Lys Ala Glu Leu Gln Arg Gly Met Ser Lys Ala  
 1355 1360 1365

Asn Ser Glu Val Ala Gln Trp Arg Thr Lys Tyr Glu Thr Asp Ala  
 1370 1375 1380

Ile Gln Arg Thr Glu Glu Leu Glu Glu Ala Lys Lys Lys Leu Ala  
 1385 1390 1395

Gln Arg Leu Gln Asp Ala Glu Glu His Val Glu Ala Val Asn Ser  
 1400 1405 1410

Lys Cys Ala Ser Leu Glu Lys Thr Lys Gln Arg Leu Gln Asn Glu  
 1415 1420 1425

Val Glu Asp Leu Met Ile Asp Val Glu Arg Ser Asn Ala Ala Cys  
 1430 1435 1440

Ile Ala Leu Asp Lys Lys Gln Arg Asn Phe Asp Lys Val Leu Ala  
 1445 1450 1455

Glu Trp Lys Gln Lys Tyr Glu Glu Thr Gln Ala Glu Leu Glu Ala  
 1460 1465 1470

Ser Gln Lys Glu Ser Arg Ser Leu Ser Thr Glu Leu Phe Lys Val  
 1475 1480 1485

Lys Asn Ala Tyr Glu Glu Ser Leu Asp His Leu Glu Thr Leu Lys  
 1490 1495 1500

Arg Glu Asn Lys Asn Leu Gln Gln Glu Ile Ser Asp Leu Thr Glu  
 1505 1510 1515

Gln Ile Ala Glu Gly Gly Lys His Ile His Glu Leu Glu Lys Val  
 1520 1525 1530

Lys Lys Gln Leu Asp His Glu Lys Ser Glu Leu Gln Thr Ser Leu  
 1535 1540 1545

Glu Glu Ala Glu Ala Ser Leu Glu His Glu Glu Gly Lys Ile Leu  
 1550 1555 1560

Arg Ile Gln Leu Glu Leu Asn Gln Val Lys Ser Glu Ile Asp Arg  
 1565 1570 1575

Lys Ile Ala Glu Lys Asp Glu Glu Leu Asp Gln Leu Lys Arg Asn  
 1580 1585 1590

His Leu Arg Val Val Glu Ser Met Gln Ser Thr Leu Asp Ala Glu  
 1595 1600 1605

Ile Arg Ser Arg Asn Asp Ala Leu Arg Ile Lys Lys Lys Met Glu  
 1610 1615 1620

Gly Asp Leu Asn Glu Met Glu Ile Gln Leu Asn His Ala Asn Arg  
 1625 1630 1635

Gln Ala Ala Glu Ala Leu Arg Asn Leu Arg Asn Thr Gln Gly Ile  
 1640 1645 1650

Leu Lys Asp Thr Gln Leu His Leu Asp Asp Ala Ile Arg Gly Gln  
 1655 1660 1665

Asp Asp Leu Lys Glu Gln Leu Ala Met Val Glu Arg Arg Ala Asn  
 1670 1675 1680

Leu Met Gln Ala Glu Val Glu Glu Leu Arg Ala Ser Leu Glu Arg  
 1685 1690 1695

Thr Glu Arg Gly Arg Lys Met Ala Glu Gln Glu Leu Leu Asp Ala  
 1700 1705 1710

Ser Glu Arg Val Gln Leu Leu His Thr Gln Asn Thr Ser Leu Ile  
 1715 1720 1725

Asn Thr Lys Lys Lys Leu Glu Thr Asp Ile Ser Gln Ile Gln Gly  
 1730 1735 1740

Glu Met Glu Asp Ile Val Gln Glu Ala Arg Asn Ala Glu Glu Lys  
 1745 1750 1755

Ala Lys Lys Ala Ile Thr Asp Ala Ala Met Met Ala Glu Glu Leu  
 1760 1765 1770

Lys Lys Glu Gln Asp Thr Ser Ala His Leu Glu Arg Met Lys Lys  
 1775 1780 1785

Asn Met Glu Gln Thr Val Lys Asp Leu Gln Leu Arg Leu Gly Glu  
 1790 1795 1800

Ala Glu Gln Leu Ala Leu Lys Gly Gly Lys Lys Gln Ile Gln Lys  
 1805 1810 1815

Leu Glu Ala Arg Val Arg Glu Leu Glu Ser Glu Val Glu Ser Glu  
 1820 1825 1830

Gln Lys His Asn Val Glu Ala Val Lys Gly Leu Arg Lys His Glu  
 1835 1840 1845

Arg Arg Val Lys Glu Leu Thr Tyr Gln Thr Glu Glu Asp Arg Lys  
 1850 1855 1860

Asn Ile Leu Arg Leu Gln Asp Leu Val Asp Lys Leu Gln Thr Lys  
 1865 1870 1875

Val Lys Ala Tyr Lys Arg Gln Ala Glu Glu Ala Glu Glu Gln Ser  
 1880 1885 1890

Asn Val Asn Leu Ala Lys Phe Arg Lys Leu Gln His Glu Leu Glu  
 1895 1900 1905

Glu Ala Glu Glu Arg Ala Asp Ile Ala Glu Ser Gln Val Asn Lys  
 1910 1915 1920

Leu Arg Val Lys Ser Arg Glu Val His Thr Lys Val Ile Ser Glu  
 1925 1930 1935

Glu

5 <210> 5  
 <211> 5925  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 5

atgagttctg actctgagat ggccattttt ggggaggctg ctcttttctt ccgaaagtct 60  
 gaaagggagc gaattgaagc ccagaacaag ccttttgatg ccaagacatc agtottttgtg 120  
 gtggacccta aggagtcctt tgtgaaagca acagtgacga gcagggaagg ggggaaggtg 180  
 acagctaaga ccgaagctgg agctactgta acagtgaag atgaccaagt ctccccatg 240  
 aacctccca aatatgacaa gatcgaggac atggccatga tgactcatct acacgagcct 300  
 gctgtgctgt acaacctcaa agagcgctac gcagccigga tgatctacac ctactcaggg 360  
 ttgtttctgt tcactgtcaa cccctacaag tggttgccag tgtataatgc agaagtgtg 420  
 acagcctacc gaggoaaaa gcgccaggaa gccccacccc acatcttctc catctctgac 480  
 aatgootato egttoatgot gactgatcag gagaatcagt ctatcttgat caccggagaa 540  
 tctggcgag ggaagactgt gaacaccaag cgtgtcatcc agtactttgc aacaattgca 600  
 gttactgggg agaagaagaa ggaagaagtt acttctggca aatgcaggg gaotctgaa 660  
 gatcaaatca tcagtccaa cccctactg gaggccttg gcaacgcaa gacctgagg 720  
 aatgacaact cctctcgctt tggtaattc atcaggatcc acttcggtac cacagggaaa 780  
 ctggcttctg ctgatattga aacatatctt ctggagaagt cttagattac ttccagcta 840  
 aaggctgaaa gaagotatca tttttttat cagatcatgt ctaacaagaa gccagatcta 900

10

attgaaatgc tcctgatcac caccaaccca tacgattatg ccttcgtcag tcaaggggag 960  
 atcacagtgc ccagcattga tgaccaagaa gagttgatgg ctacagatag tgccattgaa 1020  
 attctgggct ttacttcaga tgaagaggtg tccatctata agctcacagg ggctgtgatg 1080  
 cattatggga acatgaaatt caagcaaaag cagcgtgagg agcaagctga gccagatggc 1140  
 aotgaagtg ctgacaaggc agcctatctc caaaatctga actctgcaga tctgctcaaa 1200  
 gccctctgct accotagggt caaggtcggc aatgagtatg tcaccaaaagz tcaaaactgtg 1260  
 caggcagggt acaatgcagt ggggtctctg gccaaagctg tetacgataa gatgttcttg 1320  
 tggatggica cccgatcaa ccagcagctg gacaccaagc agcccaggca gtacttcatt 1380  
 ggggtcttgg acattgctgg ctttgagatc tttgatttca acagcctgga goagotgtgc 1440  
 atcaacttca ccaatgagaa actgcaacag ttttcaacc accacatgtt cgtgctggag 1500  
 caggaggagt acaagaagga aggcattgag tggacgttca ttgactttgg gatggacctg 1560  
 gctgcctgca tggagctcat cgagaagoot atgggcatct tctcoatcot ggaagaggag 1620  
 tgcstgttcc ccaaggcgac agacacctcc ttcaagaaca agctgtatga scaacatctt 1680  
 ggaaatcca ataacttcca gaagcccaag cctgccaaag gcaagcctga ggcccacttc 1740  
 tctttgatto actatgctgg cacogtggac tacaacattg ccggotggct tgacaagaac 1800  
 aaggaccccc tgaatgagac tgtggtggg ctgtaccaga agtctgcaat gaagactctg 1860  
 gctotcotot ttgttggggo aacgggagcg gaagcagagg ctggcgggtg aaagaaggt 1920  
 ggtagaaga aggtttcttc tticcagact gtgtcggctc tcttcaggga gaatttgaat 1980  
 aagctgatga ccaacttgag gagcactcac ccccactttg tgcggtgcat catccccaat 2040  
 gaaactaaaa ctctggtgc catggagcat gagcttctcc tgcctcagct gaggtgtaac 2100  
 ggtgtgctgg aaggcatoog catctgcagg aaaggcttcc caagoagaat cctttatgca 2160  
 gacttcaaac agagatacaa ggtgttaaat gcaagtgcta tccctgaagg acatttcctc 2220  
 gatagcaaga aggcttcaga gaagctcotg gggctcattg acettgacca caccagtat 2280  
 aaatttgto acaccaaggt cttttcaaa gctggctctc tgggctoot agazzagatg 2340

cgagatgaga agctggccca gotgattacc cgaaccocagg ccatgtgcag agggttcttg 2400  
 gcaagagtgg agtaccagaa aatggtagaa agaagagagt ccatctcttg catccagtac 2460  
 aatgtccgtg ccttcattga tgtaagcac tggccctgga tgaagctgta tttcaagatc 2520  
 aaaccctcc tcaaaagtgc agagacagag aaggagatgg ccaacatgaa ggaagaattt 2580  
 gagaaaacca aagaagagct ggctaagacc gaggcansaa gaaagagct ggaagaaaaa 2640  
 atggtgactc tgatgcaaga aaaaatgac ttgcaactcc aggttcaagc tgaagctgac 2700  
 agcttggctg atgcagagga aaggtgtgac cagctaataa aaaccanaat ccagctagaa 2760  
 gccanaataa aagaggtgac tgagagagct gaggatgagg aagagatcaa tgctgagctg 2820  
 acagccaaga agaggaact ggagatgaa tgttcagaac tcaagaaga cattgatgac 2880  
 cttgagctga cactggccaa gttgagaag gagaacatg ccacagaaa caaggtgaaa 2940  
 aacctcacag aagagatggc eggctggat gaaaccattg ctaagctgac caaggagaag 3000  
 aagctctcc aggaggccca ccagcagacc ctgatgacc tgcaggcaga ggaggacaaa 3060  
 gtcaacccc tgaccaagc taaatcaaa cttgaacaac aagtggatga tottgaagga 3120  
 tctttgaaac aagaaagaa aatccgatg gatotagaaa gagcaagag aaaaatagag 3180  
 ggagacctaa aattggctca agaatccga atgatatag aaaaagcaa acaacaactt 3240  
 gatgaaaagc ttaaaaagaa agagttttaa atgagcggtc tgcaaaagca gattgaagat 3300  
 gaacaagccc ttggtatgca gotgoagaag aaaaatcaagg agttacaagc ccgcattgag 3360  
 gagctggagg aggaatcga ggcagagcgg gcctcccggg ccaaagcaga gaagcagoc 3420  
 tctgatctct cccgggagct ggaggagatc agtgagagcc tggagaagc cgtggggcc 3480  
 acctggccc agattgagat gaaacaaga cgggaagctg agttcaagaa aatgcccagg 3540  
 gacctggagg aggccacct acagcatgag gccacggcgg ccacctgag gaagaagcat 3600  
 gcagatagt tggccgagct tgggagcag attgacaacc tgcagcagat gaagcagaag 3660  
 ctggagaagg aagaagatga gatgaagatg gagatcagat acctigctag taacatggag 3720  
 actgtctcca aagccaaggg aaccttgaa aagatgtgcc gcgctctaga agatcaactg 3780

agtgaatta agaccaagga agaggagcag cagcggctga tcaatgacct cacagcacag 3840  
 agagcgcgcc tgcaaacaga atcaggtgaa tattcacgcc agctagatga aaaggacaca 3900  
 ctagtttcac agctctcgag gggcaacaa gcctttactc aacagattga ggaactgaaa 3960  
 aggcaacttg aaguggagat aaaggccaag agtgccttg cacatgccct gcagtcctcc 4020  
 cgccatgact gtgacctgct gcgggaacag tatgaggagg agcaggaagc caaggccgag 4080  
 ctacagagag caatgtccaa ggccaacagt gaggttgccc agtggaggac caaataigag 4140  
 acagatgcca tccagogcac agaggagctg gaggaggcca agaagaagct ggctcagcgt 4200  
 ctgcaggatg ctgaggaaca tgtagaagct gtgaatgcca aatgtgcttc ccttgagaag 4260  
 acgaagcaga ggtccagaa tgaagttgag gacctcatga ttgatgttga gaggacaat 4320  
 gctgcctgtg ccgccctgga caaaaagcaa aggaactttg ataagatcct ggcagaatgg 4380  
 aacagaagt gigaagaac tcatgctgaa ctggaagctt ctcaaaagga atcccgtca 4440  
 ctcagcacag aactattta gattaagaat gcttatgagg atcttttga ccaacttgaa 4500  
 acottgaac gggaaaataa gaatctgag caggagattt ctgatctcac tgaacagatt 4560  
 gcagaaggag gaaagcgcat ccatgaactg gaaaaataa agaagcaagt tgagcaagaa 4620  
 aagtctgac ttcaggetgc cttagaggag gcagaggcat ctcttgaaca tgaagagga 4680  
 aagatcctgc gcatccagct tgagttgac caagtcaagt ctgaggttga taggaaatt 4740  
 gctgaaaag atgaggaaat tgaccagatg aagagaacc acattagaat cgtggagtcc 4800  
 atgcagagca cactggatgc tgagatcagg agcaggaatg atgccattag gctcaagaag 4860  
 aagatggagg gagacctca tgaatgaa atccagctga accatgcaa ccgcatggct 4920  
 gctgaggccc tggggaacta taggaacacc caagccatcc tcaaggatac ccagctccac 4980  
 ctgatgatg ctctccggag ccaagaggac ctgaaggaac agctggctat ggtggagcgc 5040  
 agagccaacc tgctgcagc tgagatcgag gaactacgag ccactctgga acagacggag 5100  
 aggagcagga aatcgcaga acaggagctc ctggatgcca gtaacgigt tcagctcotg 5160  
 cacaccaga acaccagct gatcaacacc aagaagaagc tggagacaga catttccaa 5220

atccaggag agatggaaga catcatccag gaagcccga atgcagaaga gaaggccaag 5280  
 aaggccatca ctgatctgc catgatggct gaggagctga agaaggaaca ggacaccagc 5340  
 gcccatctgg agcggatgaa gaagaacttg gaacagacgg tgaaggacct gcagcatcgt 5400  
 ctggatgagg ctgagcagct gccctgaag gctggaaga agcagatcca gaaactggag 5460  
 gccagggtc gtgaacttga aggtgaagtt gaaagtgaac agaagcgoan tgttgaagct 5520  
 gtcaagggtc tacgcaaaca tgagagaana gtgaaggaac tcacttacca aactgaggaa 5580  
 gaccgcaaga atattotcag gctgcaggac ctggtggaca agctgcaagc aaagtgaaa 5640  
 toctacaaga gacaagctga agaagcggag gaacaatoca acgtcaacct ctccaaatc 5700  
 cggaggatcc agcaccagct ggaggaggcc gaggaaagg ctgacattgc tgagtcccag 5760  
 gtcaacaagc tgagggtgaa gacagggag gttcacacaa aatcataag tgaagagtaa 5820  
 tttatctaac tgctgaagg tgaccaaaga aatgcacaaa atgtgaaat ctttgtcaat 5880  
 ccattttgta cttatgactt ttggagataa aaaatttatc tgcca 5925

<210> 6  
 <211> 1939  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 6

Met Ser Ser Asp Ser Glu Met Ala Ile Phe Gly Glu Ala Ala Pro Phe  
 1 5 10 15

Leu Arg Lys Ser Glu Arg Glu Arg Ile Glu Ala Gln Asn Lys Pro Phe  
 20 25 30

Asp Ala Lys Thr Ser Val Phe Val Val Asp Pro Lys Glu Ser Phe Val  
 35 40 45

Lys Ala Thr Val Gln Ser Arg Glu Gly Gly Lys Val Thr Ala Lys Thr  
 50 55 60

10

Glu Ala Gly Ala Thr Val Thr Val Lys Asp Asp Gln Val Phe Pro Met  
 65 70 75 80

Asn Pro Pro Lys Tyr Asp Lys Ile Glu Asp Met Ala Met Met Thr His  
 85 90 95

Leu His Glu Pro Ala Val Leu Tyr Asn Leu Lys Glu Arg Tyr Ala Ala  
 100 105 110

Trp Met Ile Tyr Thr Tyr Ser Gly Leu Phe Cys Val Thr Val Asn Pro  
 115 120 125

Tyr Lys Trp Leu Pro Val Tyr Asn Ala Glu Val Val Thr Ala Tyr Arg  
 130 135 140

Gly Lys Lys Arg Gln Glu Ala Pro Pro His Ile Phe Ser Ile Ser Asp  
 145 150 155 160

Asn Ala Tyr Gln Phe Met Leu Thr Asp Arg Glu Asn Gln Ser Ile Leu  
 165 170 175

Ile Thr Gly Glu Ser Gly Ala Gly Lys Thr Val Asn Thr Lys Arg Val  
 180 185 190

Ile Gln Tyr Phe Ala Thr Ile Ala Val Thr Gly Glu Lys Lys Lys Glu  
 195 200 205

Glu Val Thr Ser Gly Lys Met Gln Gly Thr Leu Glu Asp Gln Ile Ile  
 210 215 220

Ser Ala Asn Pro Leu Leu Glu Ala Phe Gly Asn Ala Lys Thr Val Arg  
 225 230 235 240

Asn Asp Asn Ser Ser Arg Phe Gly Lys Phe Ile Arg Ile His Phe Gly  
 245 250 255

Thr Thr Gly Lys Leu Ala Ser Ala Asp Ile Glu Thr Tyr Leu Leu Glu  
 260 265 270

Lys Ser Arg Val Thr Phe Gln Leu Lys Ala Glu Arg Ser Tyr His Ile  
 275 280 285

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

Leu Ile Thr Thr Asn Pro Tyr Asp Tyr Ala Phe Val Ser Gln Gly Glu  
 305 310 315 320

Ile Thr Val Pro Ser Ile Asp Asp Gln Glu Glu Leu Met Ala Thr Asp  
 325 330 335

Ser Ala Ile Glu Ile Leu Gly Phe Thr Ser Asp Glu Arg Val Ser Ile  
 340 345 350

Tyr Lys Leu Thr Gly Ala Val Met His Tyr Gly Asn Met Lys Phe Lys  
 355 360 365

Gln Lys Gln Arg Glu Glu Gln Ala Glu Pro Asp Gly Thr Glu Val Ala  
 370 375 380

Asp Lys Ala Ala Tyr Leu Gln Asn Leu Asn Ser Ala Asp Leu Leu Lys  
 385 390 395 400

Ala Leu Cys Tyr Pro Arg Val Lys Val Gly Asn Glu Tyr Val Thr Lys  
 405 410 415

Gly Gln Thr Val Gln Gln Val Tyr Asn Ala Val Gly Ala Leu Ala Lys  
 420 425 430

Ala Val Tyr Asp Lys Met Phe Leu Trp Met Val Thr Arg Ile Asn Gln  
 435 440 445

Gln Leu Asp Thr Lys Gln Pro Arg Gln Tyr Phe Ile Gly Val Leu Asp  
 450 455 460

Ile Ala Gly Phe Glu Ile Phe Asp Phe Asn Ser Leu Glu Gln Leu Cys  
 465 470 475 480

Ile Asn Phe Thr Asn Glu Lys Leu Gln Gln Phe Phe Asn His His Met  
 485 490 495

Phe Val Leu Glu Gln Glu Glu Tyr Lys Lys Glu Gly Ile Glu Trp Thr  
 500 505 510

Phe Ile Asp Phe Gly Met Asp Leu Ala Ala Cys Ile Glu Leu Ile Glu  
 515 520 525

Lys Pro Met Gly Ile Phe Ser Ile Leu Glu Glu Glu Cys Met Phe Pro  
 530 535 540

Lys Ala Thr Asp Thr Ser Phe Lys Asn Lys Leu Tyr Glu Gln His Leu  
 545 550 555 560

Gly Lys Ser Asn Asn Phe Gln Lys Pro Lys Pro Ala Lys Gly Lys Pro  
 565 570 575

Glu Ala His Phe Ser Leu Ile His Tyr Ala Gly Thr Val Asp Tyr Asn  
 580 585 590

Ile Ala Gly Trp Leu Asp Lys Asn Lys Asp Pro Leu Asn Glu Thr Val  
 595 600 605

Val Gly Leu Tyr Gln Lys Ser Ala Met Lys Thr Leu Ala Leu Leu Phe  
 610 615 620

Val Gly Ala Thr Gly Ala Glu Ala Glu Ala Gly Gly Gly Lys Lys Gly  
 625 630 635 640

Gly Lys Lys Lys Gly Ser Ser Phe Gln Thr Val Ser Ala Leu Phe Arg  
 645 650 655

Glu Asn Leu Asn Lys Leu Met Thr Asn Leu Arg Ser Thr His Pro His  
 660 665 670

Phe Val Arg Cys Ile Ile Pro Asn Glu Thr Lys Thr Pro Gly Ala Met  
 675 680 685

Glu His Glu Leu Val Leu His Gln Leu Arg Cys Asn Gly Val Leu Glu  
 690 695 700

Gly Ile Arg Ile Cys Arg Lys Gly Phe Pro Ser Arg Ile Leu Tyr Ala  
 705 710 715 720

Asp Phe Lys Gln Arg Tyr Lys Val Leu Asn Ala Ser Ala Ile Pro Glu  
 725 730 735

Gly Gln Phe Ile Asp Ser Lys Lys Ala Ser Glu Lys Leu Leu Gly Ser  
 740 745 750

Ile Asp Ile Asp His Thr Gln Tyr Lys Phe Gly His Thr Lys Val Phe  
 755 760 765

Phe Lys Ala Gly Leu Leu Gly Leu Leu Glu Glu Met Arg Asp Glu Lys  
 770 775 780

Leu Ala Gln Leu Ile Thr Arg Thr Gln Ala Met Cys Arg Gly Phe Leu  
 785 790 795 800

Ala Arg Val Glu Tyr Gln Lys Met Val Glu Arg Arg Glu Ser Ile Phe  
 805 810 815

Cys Ile Gln Tyr Asn Val Arg Ala Phe Met Asn Val Lys His Trp Pro  
 820 825 830

Trp Met Lys Leu Tyr Phe Lys Ile Lys Pro Leu Leu Lys Ser Ala Glu  
 835 840 845

Thr Glu Lys Glu Met Ala Asn Met Lys Glu Glu Phe Glu Lys Thr Lys  
 850 855 860

Glu Glu Leu Ala Lys Thr Glu Ala Lys Arg Lys Glu Leu Glu Glu Lys  
 865 870 875 880

Met Val Thr Leu Met Gln Glu Lys Asn Asp Leu Gln Leu Gln Val Gln  
 885 890 895

Ala Glu Ala Asp Ser Leu Ala Asp Ala Glu Glu Arg Cys Asp Gln Leu  
 900 905 910

Ile Lys Thr Lys Ile Gln Leu Glu Ala Lys Ile Lys Glu Val Thr Glu  
 915 920 925

Arg Ala Glu Asp Glu Glu Glu Ile Asn Ala Glu Leu Thr Ala Lys Lys  
 930 935 940

Arg Lys Leu Glu Asp Glu Cys Ser Glu Leu Lys Lys Asp Ile Asp Asp  
 945 950 955 960

Leu Glu Leu Thr Leu Ala Lys Val Glu Lys Glu Lys His Ala Thr Glu  
 965 970 975

Asn Lys Val Lys Asn Leu Thr Glu Glu Met Ala Gly Leu Asp Glu Thr  
 980 985 990

Ile Ala Lys Leu Thr Lys Glu Lys Lys Ala Leu Gln Glu Ala His Gln  
 995 1000 1005

Gln Thr Leu Asp Asp Leu Gln Ala Glu Glu Asp Lys Val Asn Thr  
 1010 1015 1020

Leu Thr Lys Ala Lys Ile Lys Leu Glu Gln Gln Val Asp Asp Leu  
 1025 1030 1035  
 Glu Gly Ser Leu Glu Gln Glu Lys Lys Ile Arg Met Asp Leu Glu  
 1040 1045 1050  
 Arg Ala Lys Arg Lys Leu Glu Gly Asp Leu Lys Leu Ala Gln Glu  
 1055 1060 1065  
 Ser Ala Met Asp Ile Glu Asn Asp Lys Gln Gln Leu Asp Glu Lys  
 1070 1075 1080  
 Leu Lys Lys Lys Glu Phe Glu Met Ser Gly Leu Gln Ser Lys Ile  
 1085 1090 1095  
 Glu Asp Glu Gln Ala Leu Gly Met Gln Leu Gln Lys Lys Ile Lys  
 1100 1105 1110  
 Glu Leu Gln Ala Arg Ile Glu Glu Leu Glu Glu Glu Ile Glu Ala  
 1115 1120 1125  
 Glu Arg Ala Ser Arg Ala Lys Ala Glu Lys Gln Arg Ser Asp Leu  
 1130 1135 1140  
 Ser Arg Glu Leu Glu Glu Ile Ser Glu Arg Leu Glu Glu Ala Gly  
 1145 1150 1155  
 Gly Ala Thr Ser Ala Gln Ile Glu Met Asn Lys Lys Arg Glu Ala  
 1160 1165 1170  
 Glu Phe Gln Lys Met Arg Arg Asp Leu Glu Glu Ala Thr Leu Gln  
 1175 1180 1185  
 His Glu Ala Thr Ala Ala Thr Leu Arg Lys Lys His Ala Asp Ser  
 1190 1195 1200

Val Ala Glu Leu Gly Glu Gln Ile Asp Asn Leu Gln Arg Val Lys  
 1205 1210 1215

Gln Lys Leu Glu Lys Glu Lys Ser Glu Met Lys Met Glu Ile Asp  
 1220 1225 1230

Asp Leu Ala Ser Asn Met Glu Thr Val Ser Lys Ala Lys Gly Asn  
 1235 1240 1245

Leu Glu Lys Met Cys Arg Ala Leu Glu Asp Gln Leu Ser Glu Ile  
 1250 1255 1260

Lys Thr Lys Glu Glu Glu Gln Gln Arg Leu Ile Asn Asp Leu Thr  
 1265 1270 1275

Ala Gln Arg Ala Arg Leu Gln Thr Glu Ser Gly Glu Tyr Ser Arg  
 1280 1285 1290

Gln Leu Asp Glu Lys Asp Thr Leu Val Ser Gln Leu Ser Arg Gly  
 1295 1300 1305

Lys Gln Ala Phe Thr Gln Gln Ile Glu Glu Leu Lys Arg Gln Leu  
 1310 1315 1320

Glu Glu Glu Ile Lys Ala Lys Ser Ala Leu Ala His Ala Leu Gln  
 1325 1330 1335

Ser Ser Arg His Asp Cys Asp Leu Leu Arg Glu Gln Tyr Glu Glu  
 1340 1345 1350

Glu Gln Glu Ala Lys Ala Glu Leu Gln Arg Ala Met Ser Lys Ala  
 1355 1360 1365

Asn Ser Glu Val Ala Gln Trp Arg Thr Lys Tyr Glu Thr Asp Ala  
 1370 1375 1380

Ile Gln Arg Thr Glu Glu Leu Glu Glu Ala Lys Lys Lys Leu Ala  
 1385 1390 1395

Gln Arg Leu Gln Asp Ala Glu Glu His Val Glu Ala Val Asn Ala  
 1400 1405 1410

Lys Cys Ala Ser Leu Glu Lys Thr Lys Gln Arg Leu Gln Asn Glu  
 1415 1420 1425

Val Glu Asp Leu Met Ile Asp Val Glu Arg Thr Asn Ala Ala Cys  
 1430 1435 1440

Ala Ala Leu Asp Lys Lys Gln Arg Asn Phe Asp Lys Ile Leu Ala  
 1445 1450 1455

Glu Trp Lys Gln Lys Cys Glu Glu Thr His Ala Glu Leu Glu Ala  
 1460 1465 1470

Ser Gln Lys Glu Ser Arg Ser Leu Ser Thr Glu Leu Phe Lys Ile  
 1475 1480 1485

Lys Asn Ala Tyr Glu Glu Ser Leu Asp Gln Leu Glu Thr Leu Lys  
 1490 1495 1500

Arg Glu Asn Lys Asn Leu Gln Gln Glu Ile Ser Asp Leu Thr Glu  
 1505 1510 1515

Gln Ile Ala Glu Gly Gly Lys Arg Ile His Glu Leu Glu Lys Ile  
 1520 1525 1530

Lys Lys Gln Val Glu Gln Glu Lys Ser Glu Leu Gln Ala Ala Leu  
 1535 1540 1545

Glu Glu Ala Glu Ala Ser Leu Glu His Glu Glu Gly Lys Ile Leu  
 1550 1555 1560

Arg Ile Gln Leu Glu Leu Asn Gln Val Lys Ser Glu Val Asp Arg  
 1565 1570 1575

Lys Ile Ala Glu Lys Asp Glu Glu Ile Asp Gln Met Lys Arg Asn  
 1580 1585 1590

His Ile Arg Ile Val Glu Ser Met Gln Ser Thr Leu Asp Ala Glu  
 1595 1600 1605

Ile Arg Ser Arg Asn Asp Ala Ile Arg Leu Lys Lys Lys Met Glu  
 1610 1615 1620

Gly Asp Leu Asn Glu Met Glu Ile Gln Leu Asn His Ala Asn Arg  
 1625 1630 1635

Met Ala Ala Glu Ala Leu Arg Asn Tyr Arg Asn Thr Gln Ala Ile  
 1640 1645 1650

Leu Lys Asp Thr Gln Leu His Leu Asp Asp Ala Leu Arg Ser Gln  
 1655 1660 1665

Glu Asp Leu Lys Glu Gln Leu Ala Met Val Glu Arg Arg Ala Asn  
 1670 1675 1680

Leu Leu Gln Ala Glu Ile Glu Glu Leu Arg Ala Thr Leu Glu Gln  
 1685 1690 1695

Thr Glu Arg Ser Arg Lys Ile Ala Glu Gln Glu Leu Leu Asp Ala  
 1700 1705 1710

Ser Glu Arg Val Gln Leu Leu His Thr Gln Asn Thr Ser Leu Ile  
 1715 1720 1725

Asn Thr Lys Lys Lys Leu Glu Thr Asp Ile Ser Gln Ile Gln Gly  
 1730 1735 1740

Glu Met Glu Asp Ile Ile Gln Glu Ala Arg Asn Ala Glu Glu Lys  
 1745 1750 1755

Ala Lys Lys Ala Ile Thr Asp Ala Ala Met Met Ala Glu Glu Leu  
 1760 1765 1770

Lys Lys Glu Gln Asp Thr Ser Ala His Leu Glu Arg Met Lys Lys  
 1775 1780 1785

Asn Leu Glu Gln Thr Val Lys Asp Leu Gln His Arg Leu Asp Glu  
 1790 1795 1800

Ala Glu Gln Leu Ala Leu Lys Gly Gly Lys Lys Gln Ile Gln Lys  
 1805 1810 1815

Leu Glu Ala Arg Val Arg Glu Leu Glu Gly Glu Val Glu Ser Glu  
 1820 1825 1830

Gln Lys Arg Asn Val Glu Ala Val Lys Gly Leu Arg Lys His Glu  
 1835 1840 1845

Arg Lys Val Lys Glu Leu Thr Tyr Gln Thr Glu Glu Asp Arg Lys  
 1850 1855 1860

Asn Ile Leu Arg Leu Gln Asp Leu Val Asp Lys Leu Gln Ala Lys  
 1865 1870 1875

Val Lys Ser Tyr Lys Arg Gln Ala Glu Glu Ala Glu Glu Gln Ser  
 1880 1885 1890

Asn Val Asn Leu Ser Lys Phe Arg Arg Ile Gln His Glu Leu Glu  
 1895 1900 1905

Glu Ala Glu Glu Arg Ala Asp Ile Ala Glu Ser Gln Val Asn Lys  
 1910 1915 1920

Leu Arg Val Lys Ser Arg Glu Val His Thr Lys Ile Ile Ser Glu  
 1925 1930 1935

**Glu**

- <210> 7
- <211> 2633
- 5 <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (38)..(2584)
- <223>
- <400> 7

55	ccgcgccaag aacatcccctc ccagccagca gattaca atg ctg caa act aag gat Met Leu Gln Thr Lys Asp 1 5
103	ctc atc tgg act ttg ttt ttc ctg gga act gca gtt tct ctg cag gtg Leu Ile Trp Thr Leu Phe Phe Leu Gly Thr Ala Val Ser Leu Gln Val 10 15 20
151	gat att gtt ccc agc cag ggg gag atc agc gtt gga gag tcc aaa ttc Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val Gly Glu Ser Lys Phe 25 30 35
199	tto tta tgc caa gtg gca gga gat gcc aaa gat aaa gac atc tcc tgg Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly Asp Ala Lys Asp Lys Asp Ile Ser Trp 40 45 50
247	ttc tcc ccc aat gga gaa aag ctc acc cca aac cag cag cgg atc tca Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro Asn Gln Gln Arg Ile Ser 55 60 65 70
296	gtg gtg tgg aat gat gat tcc tcc tcc acc ctc acc atc tat aac gcc Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ile Tyr Asn Ala 75 80 85
343	aac atc gac gac gcc ggc att tac aag tgt gte gtt aca gcc gag gat Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Val Thr Gly Glu Asp 90 95 100

15

ggc agt gag tca gag gcc acc gtc aac gtg aag ato ttt cag aag otc Gly Ser Glu Ser Glu Ala Thr Val Asn Val Lys Ile Phe Gln Lys Leu 105 110 115	391
atg ttc aag aat gcg cca acc cca cag gag ttc cgg gag egg gaa gat Met Phe Lys Asn Ala Pro Thr Pro Gln Glu Phe Arg Glu Gly Glu Asp 120 125 130	439
gcc gtg att gtg tgt gat gtg gtc agc tcc ctc cca cca acc atc atc Ala Val ile Val Cys Asp Val Val Ser Ser Leu Pro Pro Thr Ile Ile 135 140 145 150	487
tgg aaa cac aaa gcc cga gat gtc atc ctg aaa aaa gat gtc cga ttc Trp Lys His Lys Lys Gly Arg Asp Val Ile Leu Lys Lys Asp Val Arg Phe 155 160 165	535
ata gtc ctg tcc aac aac tac ctg cag atc cgg gcc atc aag aaa aca Ile Val Leu Ser Asn Asn Tyr Leu Gln Ile Arg Gly Ile Lys Lys Thr 170 175 180	583
gat gag gcc act tat cgc tgt gag gcc aga atc ctg gca cgg egg gag Asp Glu Gly Thr Tyr Arg Cys Glu Gly Arg Ile Leu Ala Arg Gly Glu 185 190 195	631
atc aac ttc aag gac att cag gtc att gtg aat gtg cca cct acc atc Ile Asn Phe Lys Asp Ile Gln Val Ile Val Asn Val Pro Pro Thr Ile 200 205 210	679
cgg gcc agg cag aat att gtg aat gcc acc gcc aac ctc gcc cag tcc Arg Ala Arg Gln Asn Ile Val Asn Ala Thr Ala Asn Leu Gly Gln Ser 215 220 225 230	727
gtc acc ctg gtg tgc gat gcc gaa cgg ttc cca gag ccc acc atg agc Val Thr Leu Val Cys Asp Ala Glu Arg Phe Pro Glu Pro Thr Met Ser 235 240 245	775
tgg aca aag gat egg gaa cag ata gag caa gag gaa gac gat gag aag Trp Thr Lys Asp Gly Glu Gln Ile Glu Gln Glu Glu Asp Asp Glu Lys 250 255 260	823
tac atc ttc agc gac gat agt tcc cag ctg acc atc aaa aag gtg gat Tyr Ile Phe Ser Asp Asp Ser Ser Gln Leu Thr Ile Lys Lys Val Asp 265 270 275	871
aag aac gac gag gct gag tac atc tgc att gct gag aac aag gct gcc Lys Asn Asp Glu Ala Glu Tyr Ile Cys Ile Ala Glu Asn Lys Ala Gly 280 285 290	919

gag cag gat gcg acc atc cac ctc aaa gtc ttt gca aaa ccc aaa atc Glu Gln Asp Ala Thr Ile His Leu Lys Val Phe Ala Lys Pro Lys Ile 295 300 305 310	967
aca tat gta gag aac cag act gcc atg gaa tta gag gag cag gtc act Thr Tyr Val Glu Asn Gln Thr Ala Met Glu Leu Glu Glu Gln Val Thr 315 320 325	1015
ctt acc tgt gaa gcc tcc gga gac ccc att ccc tcc atc acc tgg agg Leu Thr Cys Glu Ala Ser Gly Asp Pro Ile Pro Ser Ile Thr Trp Arg 330 335 340	1063
act tct acc cgg aac atc agc agc gaa gaa aag act ctg gat ggg cac Thr Ser Thr Arg Asn Ile Ser Ser Glu Glu Lys Thr Leu Asp Gly His 345 350 355	1111
atg gtg gtg cgt agc cat gcc cgt gtg tcg tcg ctg acc ctg aag agc Met Val Val Arg Ser His Ala Arg Val Ser Ser Leu Thr Leu Lys Ser 360 365 370	1159
atc cag tac act gat gcc gga gag tac atc tgc acc gcc agc aac acc Ile Gln Tyr Thr Asp Ala Gly Glu Tyr Ile Cys Thr Ala Ser Asn Thr 375 380 385 390	1207
atc gcc cag gac tcc cag tcc atg tac ctt gaa gtg caa tat gcc cca Ile Gly Gln Asp Ser Gln Ser Met Tyr Leu Glu Val Gln Tyr Ala Pro 395 400 405	1255
aag cta cag ggc cct gtg got gtg tac act tgg gag ggg aac cag gtg Lys Leu Gln Gly Pro Val Ala Val Tyr Thr Trp Glu Gly Asn Gln Val 410 415 420	1303
aac atc acc tgc gag gta ttt gcc tat ccc agt gcc acg atc tca tge Asn Ile Thr Cys Glu Val Phe Ala Tyr Pro Ser Ala Thr Ile Ser Trp 425 430 435	1351
ttt cgg gat gcc cag ctg ctg cca agc tcc aat tac agc aat atc aag Phe Arg Asp Gly Gln Leu Leu Pro Ser Ser Asn Tyr Ser Asn Ile Lys 440 445 450	1399
atc tac aac acc ccc tct gcc agc tat ctg gag gtg acc cca gac tct Ile Tyr Asn Thr Pro Ser Ala Ser Tyr Leu Glu Val Thr Pro Asp Ser 455 460 465 470	1447
gag aat gat ttt ggg aac tac aac tgt act gca gtg aac cgc att ggg Glu Asn Asp Phe Gly Asn Tyr Asn Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile Gly 475 480 485	1495

cag gag tcc ttc gaa ttc atc ctt gtt caa gca gac acc ccc tot tca 1543  
 Gln Glu Ser Phe Glu Phe Ile Leu Val Gln Ala Asp Thr Pro Ser Ser  
 490 495 500

cca tcc atc gac cag gtg gag cca tac tcc agc aca gcc cag gtg cag 1591  
 Pro Ser Ile Asp Gln Val Glu Pro Tyr Ser Ser Thr Ala Gln Val Gln  
 505 510 515

ttt gat gaa cca gag gcc aca ggt ggg gtg ccc atc ctc aaa tac aaa 1639  
 Phe Asp Glu Pro Glu Ala Thr Gly Gly Val Pro Ile Leu Lys Tyr Lys  
 520 525 530

gct gag tgg aga gca gtg ggt gaa gaa gta tgg cat tcc aag tgg tat 1687  
 Ala Glu Trp Arg Ala Val Gly Glu Glu Val Trp His Ser Lys Trp Tyr  
 535 540 545 550

gat gcc aag gaa gcc agc atg gag ggc atc gtc acc atc gtg ggc ctg 1735  
 Asp Ala Lys Glu Ala Ser Met Glu Gly Ile Val Thr Ile Val Gly Leu  
 555 560 565

aag ccc gaa aca acg tac gcc gta agg ctg gcg gcg ctc aat ggc aaa 1783  
 Lys Pro Glu Thr Thr Tyr Ala Val Arg Leu Ala Ala Leu Asn Gly Lys  
 570 575 580

ggg ctg ggt gag atc agc gcg gcc tcc gag ttc aag acg cag cca gtc 1831  
 Gly Leu Gly Glu Ile Ser Ala Ala Ser Glu Phe Lys Thr Gln Pro Val  
 585 590 595

caa ggg gaa ccc agt gca oct aag ctc gaa ggg cag atg gga gag gat 1879  
 Gln Gly Glu Pro Ser Ala Pro Lys Leu Glu Gly Gln Met Gly Glu Asp  
 600 605 610

gga aac tot att aas gtg aao ctg atc aag oag gat gac gcc gcc tcc 1927  
 Gly Asn Ser Ile Lys Val Asn Leu Ile Lys Gln Asp Asp Gly Gly Ser  
 615 620 625 630

ccc atc aga cac tat ctg gtc agg tac cga gcg ctc tcc tcc gag tgg 1975  
 Pro Ile Arg His Tyr Leu Val Arg Tyr Arg Ala Leu Ser Ser Glu Trp  
 635 640 645

aaa cca gag atc agg ctc ccg tot ggc agt gac cac gtc atg ctg aag 2023  
 Lys Pro Glu Ile Arg Leu Pro Ser Gly Ser Asp His Val Met Leu Lys  
 650 655 660

too ctg gac tgg aat gct gag tat gag gtc tac gtg gtg got gag aao 2071  
 Ser Leu Asp Trp Asn Ala Glu Tyr Glu Val Tyr Val Val Ala Glu Asn  
 665 670 675

cag caa gga aaa tcc aag gcg gct cat ttt gtg ttc agg acc tcg gcc 2119  
 Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala Ala His Phe Val Phe Arg Thr Ser Ala  
 680 685 690

cag ccc aca gcc atc cca gcc aac ggc agc ccc acc tca ggc ctg agc 2167  
 Gln Pro Thr Ala Ile Pro Ala Asn Gly Ser Pro Thr Ser Gly Leu Ser  
 695 700 705 710

acc ggg gcc atc gtg ggc atc ctc atc gtc atc ttc gtc ctg ctc ctg 2215  
 Thr Gly Ala Ile Val Gly Ile Leu Ile Val Ile Phe Val Leu Leu Leu  
 715 720 725

gtg gtt gtg gac atc acc tgc tac ttc ctg aac aag tgt ggc ctg ttc 2263  
 Val Val Val Asp Ile Thr Cys Tyr Phe Leu Asn Lys Cys Gly Leu Phe  
 730 735 740

atg tgc att gcg gtc aac ctg tgt gga aaa gcc ggg ccc ggg gcc aag 2311  
 Met Cys Ile Ala Val Asn Leu Cys Gly Lys Ala Gly Pro Gly Ala Lys  
 745 750 755

ggc aag gac atg gag gag ggc aag gcc gcc ttc tcg aaa gat gag tcc 2359  
 Gly Lys Asp Met Glu Glu Gly Lys Ala Ala Phe Ser Lys Asp Glu Ser  
 760 765 770

aag gag ccc atc gtg gag gtt cga acg gag gag gag ggg acc cca aac 2407  
 Lys Glu Pro Ile Val Glu Val Arg Thr Glu Glu Glu Arg Thr Pro Asn  
 775 780 785 790

cat gat gga ggg aaa cac aca gag ccc aac gag acc acg cca ctg acg 2455  
 His Asp Gly Gly Lys His Thr Glu Pro Asn Glu Thr Thr Pro Leu Thr  
 795 800 805

gag ccc gag aag ggc ccc gta gaa gca aag cca gag tgc cag gag aca 2503  
 Glu Pro Glu Lys Gly Pro Val Glu Ala Lys Pro Glu Cys Gln Glu Thr  
 810 815 820

gaa acg aag cca gcg cca gcc gaa gtc aag acg gtc ccc aat gac gcc 2551  
 Glu Thr Lys Pro Ala Pro Ala Glu Val Lys Thr Val Pro Asn Asp Ala  
 825 830 835

aca cag aca aag gag aac gag agc aaa gca tga tgggtgaaga gaaccgagca 2604  
 Thr Gln Thr Lys Glu Asn Glu Ser Lys Ala  
 840 845

aagatcaaaa taaaaagtga cacagcagc 2633

<210> 8  
 <211> 848  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 8

Met Leu Gln Thr Lys Asp Leu Ile Trp Thr Leu Phe Phe Leu Gly Thr  
 1 5 10 15

Ala Val Ser Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser  
 20 25 30

Val Gly Glu Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly Asp Ala Lys  
 35 40 45

Asp Lys Asp Ile Ser Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro  
 50 55 60

Asn Gln Gln Arg Ile Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr  
 65 70 75 80

Leu Thr Ile Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys  
 85 90 95

Val Val Thr Gly Glu Asp Gly Ser Glu Ser Glu Ala Thr Val Asn Val  
 100 105 110

Lys Ile Phe Gln Lys Leu Met Phe Lys Asn Ala Pro Thr Pro Gln Glu  
 115 120 125

Phe Arg Glu Gly Glu Asp Ala Val Ile Val Cys Asp Val Val Ser Ser  
 130 135 140

Leu Pro Pro Thr Ile Ile Trp Lys His Lys Gly Arg Asp Val Ile Leu  
 145 150 155 160

Lys Lys Asp Val Arg Phe Ile Val Leu Ser Asn Asn Tyr Leu Gln Ile  
 165 170 175

Arg Gly Ile Lys Lys Thr Asp Glu Gly Thr Tyr Arg Cys Glu Gly Arg  
 180 185 190

Ile Leu Ala Arg Gly Glu Ile Asn Phe Lys Asp Ile Gln Val Ile Val  
 195 200 205

Asn Val Pro Pro Thr Ile Arg Ala Arg Gln Asn Ile Val Asn Ala Thr  
 210 215 220

Ala Asn Leu Gly Gln Ser Val Thr Leu Val Cys Asp Ala Glu Arg Phe  
 225 230 235 240

Pro Glu Pro Thr Met Ser Trp Thr Lys Asp Gly Glu Gln Ile Glu Gln  
 245 250 255

Glu Glu Asp Asp Glu Lys Tyr Ile Phe Ser Asp Asp Ser Ser Gln Leu  
 260 265 270

Thr Ile Lys Lys Val Asp Lys Asn Asp Glu Ala Glu Tyr Ile Cys Ile  
 275 280 285

Ala Glu Asn Lys Ala Gly Glu Gln Asp Ala Thr Ile His Leu Lys Val  
 290 295 300

Phe Ala Lys Pro Lys Ile Thr Tyr Val Glu Asn Gln Thr Ala Met Glu  
 305 310 315 320

Leu Glu Glu Gln Val Thr Leu Thr Cys Glu Ala Ser Gly Asp Pro Ile  
 325 330 335

Pro Ser Ile Thr Trp Arg Thr Ser Thr Arg Asn Ile Ser Ser Glu Glu  
 340 345 350

Lys Thr Leu Asp Gly His Met Val Val Arg Ser His Ala Arg Val Ser  
 355 360 365

Ser Leu Thr Leu Lys Ser Ile Gln Tyr Thr Asp Ala Gly Glu Tyr Ile  
 370 375 380

Cys Thr Ala Ser Asn Thr Ile Gly Gln Asp Ser Gln Ser Met Tyr Leu  
 385 390 395 400

Glu Val Gln Tyr Ala Pro Lys Leu Gln Gly Pro Val Ala Val Tyr Thr  
 405 410 415

Trp Glu Gly Asn Gln Val Asn Ile Thr Cys Glu Val Phe Ala Tyr Pro  
 420 425 430

Ser Ala Thr Ile Ser Trp Phe Arg Asp Gly Gln Leu Leu Pro Ser Ser  
 435 440 445

Asn Tyr Ser Asn Ile Lys Ile Tyr Asn Thr Pro Ser Ala Ser Tyr Leu  
 450 455 460

Glu Val Thr Pro Asp Ser Glu Asn Asp Phe Gly Asn Tyr Asn Cys Thr  
 465 470 475 480

Ala Val Asn Arg Ile Gly Gln Glu Ser Phe Glu Phe Ile Leu Val Gln  
 485 490 495

Ala Asp Thr Pro Ser Ser Pro Ser Ile Asp Gln Val Glu Pro Tyr Ser  
 500 505 510

Ser Thr Ala Gln Val Gln Phe Asp Glu Pro Glu Ala Thr Gly Gly Val  
 515 520 525

Pro Ile Leu Lys Tyr Lys Ala Glu Trp Arg Ala Val Gly Glu Glu Val  
 530 535 540

Trp His Ser Lys Trp Tyr Asp Ala Lys Glu Ala Ser Met Glu Gly Ile  
 545 550 555 560

Val Thr Ile Val Gly Leu Lys Pro Glu Thr Thr Tyr Ala Val Arg Leu  
 565 570 575

Ala Ala Leu Asn Gly Lys Gly Leu Gly Glu Ile Ser Ala Ala Ser Glu  
 580 585 590

Phe Lys Thr Gln Pro Val Gln Gly Glu Pro Ser Ala Pro Lys Leu Glu  
 595 600 605

Gly Gln Met Gly Glu Asp Gly Asn Ser Ile Lys Val Asn Leu Ile Lys  
 610 615 620

Gln Asp Asp Gly Gly Ser Pro Ile Arg His Tyr Leu Val Arg Tyr Arg  
 625 630 635 640

Ala Leu Ser Ser Glu Trp Lys Pro Glu Ile Arg Leu Pro Ser Gly Ser  
 645 650 655

Asp His Val Met Leu Lys Ser Leu Asp Trp Asn Ala Glu Tyr Glu Val  
 660 665 670

Tyr Val Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala Ala His Phe  
 675 680 685

Val Phe Arg Thr Ser Ala Gln Pro Thr Ala Ile Pro Ala Asn Gly Ser  
 690 695 700

Pro Thr Ser Gly Leu Ser Thr Gly Ala Ile Val Gly Ile Leu Ile Val  
 705 710 715 720

Ile Phe Val Leu Leu Leu Val Val Val Asp Ile Thr Cys Tyr Phe Leu  
 725 730 735

Asn Lys Cys Gly Leu Phe Met Cys Ile Ala Val Asn Leu Cys Gly Lys  
 740 745 750

Ala Gly Pro Gly Ala Lys Gly Lys Asp Met Glu Glu Gly Lys Ala Ala  
 755 760 765

Phe Ser Lys Asp Glu Ser Lys Glu Pro Ile Val Glu Val Arg Thr Glu  
 770 775 780

Glu Glu Arg Thr Pro Asn His Asp Gly Gly Lys His Thr Glu Pro Asn  
 785 790 795 800

Glu Thr Thr Pro Leu Thr Glu Pro Glu Lys Gly Pro Val Glu Ala Lys  
 805 810 815

Pro Glu Cys Gln Glu Thr Glu Thr Lys Pro Ala Pro Ala Glu Val Lys  
 820 825 830

Thr Val Pro Asn Asp Ala Thr Gln Thr Lys Glu Asn Glu Ser Lys Ala  
 835 840 845

<210> 9  
 <211> 1692  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*:

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (121)..(1080)  
 <223>

<300>  
 <308> X56677  
 <309> 19-03-1991  
 <313> (1)..(1692)

<400> 9

attcagactg ccagcacttt gctatctaca gccggggctc ccgagcggca gaaagtccg 60

gccactctct gccgcttggg ttggcgaa gccaggaocg tgccgcgcca ccgccaggat 120

atg gag cta ctg tcg cca ccg ctc cgc gac gta gac ctg acg gcc ccc 168  
 Met Glu Leu Leu Ser Pro Pro Leu Arg Asp Val Asp Leu Thr Ala Pro

5

10

15

20

1	5	10	15	
gac ggc tct ctc tgc tcc ttt gcc aca acg gac gac ttc tat gac gac				216
Asp Gly Ser Leu Cys Ser Phe Ala Thr Thr Asp Asp Phe Tyr Asp Asp				
	20	25	30	
cag tgt ttc gac tcc ccg gac ctg cgc ttc ttc gaa gac ctg gac ccg				264
Pro Cys Phe Asp Ser Pro Asp Leu Arg Phe Phe Glu Asp Leu Asp Pro				
	35	40	45	
cgc ctg atg cac gtg ggc gcg ctc ctg aaa ccc gaa gag cac tcg cac				312
Arg Leu Met His Val Gly Ala Leu Leu Lys Pro Glu Glu His Ser His				
	50	55	60	
ttc ccc gcg gcg gtg cac ccg gcc ccg ggc gca cgt gag gac gag cat				360
Phe Pro Ala Ala Val His Pro Ala Pro Gly Ala Arg Glu Asp Glu His				
	65	70	75	80
gtg cgc gcg ccc agc ggg cac cac cag gcg ggc cgc tgc cta ctg tgg				408
Val Arg Ala Pro Ser Gly His His Gln Ala Gly Arg Cys Leu Leu Trp				
	85	90	95	
gcc tgc aag gcg tgc aag cgc aag acc acc aac gcc gac cgc cgc aag				456
Ala Cys Lys Ala Cys Lys Arg Lys Thr Thr Asn Ala Asp Arg Arg Lys				
	100	105	110	
gcc gcc acc atg cgc gag cgg cgc cgc ctg ago aaa gta aat gag gcc				504
Ala Ala Thr Met Arg Glu Arg Arg Arg Leu Ser Lys Val Asn Glu Ala				
	115	120	125	
ttt gag aca ctc aag cgc tgc acg tcg agc aat cca aac cag cgg ttg				552
Phe Glu Thr Leu Lys Arg Cys Thr Ser Ser Asn Pro Asn Gln Arg Leu				
	130	135	140	
ccc aag gtg gag atc ctg cgc aac gcc atc cgc tat atc gag ggc ctg				600
Pro Lys Val Glu Ile Leu Arg Asn Ala Ile Arg Tyr Ile Glu Gly Leu				
	145	150	155	160
cag got ctg ctg cgc gac cag gac gcc gcg ccc cct ggc gca gcc gcc				648
Gln Ala Leu Leu Arg Asp Gln Asp Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ala				
	165	170	175	
ttc tat gcg ccg ggc ccg ctg ccc ccg ggc cgc ggc ggc gag cac tac				696
Phe Tyr Ala Pro Gly Pro Leu Pro Pro Gly Arg Gly Gly Glu His Tyr				
	180	185	190	
agc ggc gac tcc gac gcg tcc agc ccg cgc tcc aac tgc tcc gac ggc				744
Ser Gly Asp Ser Asp Ala Ser Ser Pro Arg Ser Asn Cys Ser Asp Gly				

195	200	205	
atg atg gac tac agc ggc ccc ccg agc ggc gcc cgg cgg cgg aac tgc			792
Met Met Asp Tyr Ser Gly Pro Pro Ser Gly Ala Arg Arg Arg Asn Cys			
210	215	220	
tac gaa ggc gcc tao tao aac gag gog ccc ago gaa ccc agg ccc ggg			840
Tyr Glu Gly Ala Tyr Tyr Asn Glu Ala Pro Ser Glu Pro Arg Pro Gly			
225	230	235	240
aag agt gcg gcg gtg tgg agc cta gac tac ctg tcc agc atc gtg gag			888
Lys Ser Ala Ala Val Ser Ser Leu Asp Tyr Leu Ser Ser Ile Val Glu			
245	250	255	
cgc atc tcc acc gag agc cct gcg gcg ccc gcc ctc ctg ctg gcg gac			936
Arg Ile Ser Thr Glu Ser Pro Ala Ala Pro Ala Leu Leu Leu Ala Asp			
260	265	270	
gtg cct tet gag tog cct ccg cgc agg caa gag gct gcc gcc ccc agc			984
Val Pro Ser Glu Ser Pro Pro Arg Arg Gln Glu Ala Ala Ala Pro Ser			
275	280	285	
gag gga gag agc agc ggc gac ccc acc cag tca ccg gac gcc gcc ccg			1032
Glu Gly Glu Ser Ser Gly Asp Pro Thr Gln Ser Pro Asp Ala Ala Pro			
290	295	300	
cag tgc cct gcg ggt gcg aac ccc aac ccg ata tac cag gtg ctc tga			1080
Gln Cys Pro Ala Gly Ala Asn Pro Asn Pro Ile Tyr Gln Val Leu			
305	310	315	
ggggatgtg gccgccaac ccgcccagg atggtccct aggtccctc gccccaasa			1140
gattgaactt aatgcccc ctcccaacag cgtttaaa gogccatctc ttgaggtagg			1200
agagsgggag aactgaagtt tccgcccccc ccgacagggc aaggacacag cgcggtttt			1260
tccacgcagc accctctctg gagaccoatt gogatggocg ctccgtgttc ctcggtggc			1320
cagagctgaa ccttgagggg ctaggttcac gttctcgcg cctccatgg tgagaccctc			1380
gcagacctaa cctgccccg gcatgcaccg gttatttgg gggcgtgag acagtgcact			1440
ccggtccca aatgtagcagg tgaaccgta acccaacccc aaccggttc ccggttcagg			1500
accactttt gtaatnott ttgtaacta ttctgtaaa taagagtcc tttgccagag			1560
aggagccct gggctgtat ttatctctga ggcaggggtg gtggtgtac agggaattg			1620

**tacgtttata ccgcaggcgg cgcagccgcg ggcgctcgct caggtgatca aaataaaggo 1680**

**gctaatttat aa 1692**

5

<210> 10  
 <211> 319  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*:  
 <400> 10

**Met Glu Leu Leu Ser Pro Pro Leu Arg Asp Val Asp Leu Thr Ala Pro**  
**1 5 10 15**

**Asp Gly Ser Leu Cys Ser Phe Ala Thr Thr Asp Asp Phe Tyr Asp Asp**  
**20 25 30**

**Pro Cys Phe Asp Ser Pro Asp Leu Arg Phe Phe Glu Asp Leu Asp Pro**  
**35 40 45**

**Arg Leu Met His Val Gly Ala Leu Leu Lys Pro Glu Glu His Ser His**  
**50 55 60**

**Phe Pro Ala Ala Val His Pro Ala Pro Gly Ala Arg Glu Asp Glu His**  
**65 70 75 80**

**Val Arg Ala Pro Ser Gly His His Gln Ala Gly Arg Cys Leu Leu Trp**  
**85 90 95**

**Ala Cys Lys Ala Cys Lys Arg Lys Thr Thr Asn Ala Asp Arg Arg Lys**  
**100 105 110**

**Ala Ala Thr Met Arg Glu Arg Arg Arg Leu Ser Lys Val Asn Glu Ala**  
**115 120 125**

**Phe Glu Thr Leu Lys Arg Cys Thr Ser Ser Asn Pro Asn Gln Arg Leu**  
**130 135 140**

10

Pro Lys Val Glu Ile Leu Arg Asn Ala Ile Arg Tyr Ile Glu Gly Leu  
 145 150 155 160

Gln Ala Leu Leu Arg Asp Gln Asp Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ala  
 165 170 175

Phe Tyr Ala Pro Gly Pro Leu Pro Pro Gly Arg Gly Gly Glu His Tyr  
 180 185 190

Ser Gly Asp Ser Asp Ala Ser Ser Pro Arg Ser Asn Cys Ser Asp Gly  
 195 200 205

Met Met Asp Tyr Ser Gly Pro Pro Ser Gly Ala Arg Arg Arg Asn Cys  
 210 215 220

Tyr Glu Gly Ala Tyr Tyr Asn Glu Ala Pro Ser Glu Pro Arg Pro Gly  
 225 230 235 240

Lys Ser Ala Ala Val Ser Ser Leu Asp Tyr Leu Ser Ser Ile Val Glu  
 245 250 255

Arg Ile Ser Thr Glu Ser Pro Ala Ala Pro Ala Leu Leu Leu Ala Asp  
 260 265 270

Val Pro Ser Glu Ser Pro Pro Arg Arg Gln Glu Ala Ala Ala Pro Ser  
 275 280 285

Glu Gly Glu Ser Ser Gly Asp Pro Thr Gln Ser Pro Asp Ala Ala Pro  
 290 295 300

Gln Cys Pro Ala Gly Ala Asn Pro Asn Pro Ile Tyr Gln Val Leu  
 305 310 315

5 <210> 11  
 <211> 1427  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*:

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (43)..(810)

<223>

<300>

<308> NM\_005593

5 <309> 07-04-2003

<313> (1)..(1427)

<400> 11

cctctcgtcgc cagtcacaggt gcaccgcctg cctctcagca gg atg gac gtg atg 54  
Met Asp Val Met  
1

gat ggc tgc cag ttc tca cct tct gag tac ttc tac gac ggc tcc tgc 102  
Asp Gly Cys Gln Phe Ser Pro Ser Glu Tyr Phe Tyr Asp Gly Ser Cys  
5 10 15 20

ata ccg tcc oco gag ggt gaa ttt ggg gac gag ttt gtg ccg cga gtg 150  
Ile Pro Ser Pro Glu Gly Glu Phe Gly Asp Glu Phe Val Pro Arg Val  
25 30 35

gct gcc ttc gga gcg cac aaa gca gag ctg cag ggc tca gat gag gac 198  
Ala Ala Phe Gly Ala His Lys Ala Glu Leu Gln Gly Ser Asp Glu Asp  
40 45 50

gag cac gtg cga gcg cct acc ggc cac cac cag gct ggt cac tgc ctc 246  
Glu His Val Arg Ala Pro Thr Gly His His Gln Ala Gly His Cys Leu  
55 60 65

atg tgg gcc tgc aag gcc tgo aag agg aag too aco acc atg gat cgg 294  
Met Trp Ala Cys Lys Ala Cys Lys Arg Lys Ser Thr Thr Met Asp Arg  
70 75 80

ccg aag gca gcc act atg ogo gag cgg agg cgc ctg aag aag gto aac 342  
Arg Lys Ala Ala Thr Met Arg Glu Arg Arg Arg Leu Lys Lys Val Asn  
85 90 95 100

cag gct ttc gaa acc ctc aag agg tgt acc acg acc aac ccc aac cag 390  
Gln Ala Phe Glu Thr Leu Lys Arg Cys Thr Thr Thr Asn Pro Asn Gln  
105 110 115

agg ctg ccc aag gtg gag atc ctc agg aat gcc atc cgc tac atc gag 438  
Arg Leu Pro Lys Val Glu Ile Leu Arg Asn Ala Ile Arg Tyr Ile Glu  
120 125 130

10

agc ctg cag gag ttg ctg aga gag cag gtg gag aac tac tat agc ctg 486  
 Ser Leu Gln Glu Leu Leu Arg Glu Gln Val Glu Asn Tyr Tyr Ser Leu  
 135 140 145

cag gga cag agc tgc tgc gag ccc acc agc ccc acc tcc aac tgc tct 534  
 Pro Gly Gln Ser Cys Ser Glu Pro Thr Ser Pro Thr Ser Asn Cys Ser  
 150 155 160

gat ggc atg ccc gaa tgt aac agt cct gtc tgg tcc aga aag agc agt 582  
 Asp Gly Met Pro Glu Cys Asn Ser Pro Val Trp Ser Arg Lys Ser Ser  
 165 170 175 180

act ttt gac agc atc tac tgt cct gat gta tca aat gta tat gcc aca 630  
 Thr Phe Asp Ser Ile Tyr Cys Pro Asp Val Ser Asn Val Tyr Ala Thr  
 185 190 195

gat aaa aac tcc tta tcc agc ttg gat tgc tta tcc aac ata gtg gac 678  
 Asp Lys Asn Ser Leu Ser Ser Leu Asp Cys Leu Ser Asn Ile Val Asp  
 200 205 210

cgg atc acc tcc tca gag caa cct ggg ttg cct ctc cag gat ctg got 726  
 Arg Ile Thr Ser Ser Glu Gln Pro Gly Leu Pro Leu Gln Asp Leu Ala  
 215 220 225

tot ctc tet cca gtt gcc agc acc gat tca cag cct cga act cca ggg 774  
 Ser Leu Ser Pro Val Ala Ser Thr Asp Ser Gln Pro Arg Thr Pro Gly  
 230 235 240

got tot agt tcc cgg ctt atc tat cat gtg cta tga actaatttc 820  
 Ala Ser Ser Ser Arg Leu Ile Tyr His Val Leu  
 245 250 255

tggctctat gacttcttc aggaggcct aatacacagg acgaagaagg cttcaaaaag 880

tcccaaacaa agacacacatg tacataaaga ttctttttca gttgtaeatt tgaagatt 940

accctgccac ttatataaga agtgtattta actaaacagt catcattgca aataaactt 1000

tottctctt tattattctt tgcttagata ttaatacata gttccagtaa tactattct 1060

gataggggc cattgattga gggtagcttg ttccaatgct taacttatat atacatatat 1120

atatattata aatattgctc atcaaatgt ctctgggtgt tagagcttta ttttttctt 1180

taaacatta aaacagctga gaatcagtta aatggaattt taatatatt taactatttc 1240

tttctcttt aatccttag ttatattgta ttaaataaa atataaact gcctaagtga 1300

tatatttga tcttttcttg taagaaatgt atcttttaaa tgaagcaca aatagtact 1360  
 ttgtggatca tttcaagata taagaaattt tggaaattcc accataaata aaatttttta 1420  
 ctacaag 1427

5 <210> 12  
 <211> 255  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*;  
 <400> 12

Met Asp Val Met Asp Gly Cys Gln Phe Ser Pro Ser Glu Tyr Phe Tyr  
 1 5 10 15

Asp Gly Ser Cys Ile Pro Ser Pro Glu Gly Glu Phe Gly Asp Glu Phe  
 20 25 30

Val Pro Arg Val Ala Ala Phe Gly Ala His Lys Ala Glu Leu Gln Gly  
 35 40 45

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

Gly His Cys Leu Met Trp Ala Cys Lys Ala Cys Lys Arg Lys Ser Thr  
 65 70 75 80

Thr Met Asp Arg Arg Lys Ala Ala Thr Met Arg Glu Arg Arg Arg Leu  
 85 90 95

Lys Lys Val Asn Gln Ala Phe Glu Thr Leu Lys Arg Cys Thr Thr Thr  
 100 105 110

Asn Pro Asn Gln Arg Leu Pro Lys Val Glu Ile Leu Arg Asn Ala Ile  
 115 120 125

Arg Tyr Ile Glu Ser Leu Gln Glu Leu Leu Arg Glu Gln Val Glu Asn  
 130 135 140

10

Tyr Tyr Ser Leu Pro Gly Gln Ser Cys Ser Glu Pro Thr Ser Pro Thr  
 145 150 155 160

Ser Asn Cys Ser Asp Gly Met Pro Glu Cys Asn Ser Pro Val Trp Ser  
 165 170 175

Arg Lys Ser Ser Thr Phe Asp Ser Ile Tyr Cys Pro Asp Val Ser Asn  
 180 185 190

Val Tyr Ala Thr Asp Lys Asn Ser Leu Ser Ser Leu Asp Cys Leu Ser  
 195 200 205

Asn Ile Val Asp Arg Ile Thr Ser Ser Glu Gln Pro Gly Leu Pro Leu  
 210 215 220

Gln Asp Leu Ala Ser Leu Ser Pro Val Ala Ser Thr Asp Ser Gln Pro  
 225 230 235 240

Arg Thr Pro Gly Ala Ser Ser Ser Arg Leu Ile Tyr His Val Leu  
 245 250 255

<210> 13  
 <211> 675  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*;

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(675)  
 <223>

<300>  
 <308> BT007233  
 <309> 13-05-2003  
 <313> (1)..(675)

<400> 13

atg gag ctg tat gag aca tcc ccc tac ttc tac cag gaa ccc cgc ttc  
 Met Glu Leu Tyr Glu Thr Ser Pro Tyr Phe Tyr Gln Glu Pro Arg Phe

48

1	5	10	15	
tat gat ggg gaa aac tac ctg cct gtc cac cto cag ggo ttc gaa cca				96
Tyr Asp Gly Glu Asn Tyr Leu Pro Val His Leu Gln Gly Phe Glu Pro				
	20	25	30	
cca ggc tac gag cgg acg gag ctc acc ctg agc ccc gag gcc cca ggg				144
Pro Gly Tyr Glu Arg Thr Glu Leu Thr Leu Ser Pro Glu Ala Pro Gly				
	35	40	45	
ccc ctt gag gac aag ggg ctg ggg acc ccc gag cac tgt cca ggc cag				192
Pro Leu Glu Asp Lys Gly Leu Gly Thr Pro Glu His Cys Pro Gly Gln				
	50	55	60	
tgc ctg ccg tgg gcg tgt aag gtg tgt aag agg aag tcc gtg tcc gtg				240
Cys Leu Pro Trp Ala Cys Lys Val Cys Lys Arg Lys Ser Val Ser Val				
	65	70	80	
gac cgg cgg cgg gcg gcc aca ctg agg gag aag cgc agg ctc aag aag				288
Asp Arg Arg Arg Ala Ala Thr Leu Arg Glu Lys Arg Arg Leu Lys Lys				
	85	90	95	
gtg aat gag gcc ttc gag gcc ctg aag aga agc acc ctg ctc aac ccc				336
Val Asn Glu Ala Phe Glu Ala Leu Lys Arg Ser Thr Leu Leu Asn Pro				
	100	105	110	
aac cag cgg ctg ccc aag gtg gag atc ctg cgc agt gcc atc cag tac				384
Asn Gln Arg Leu Pro Lys Val Glu Ile Leu Arg Ser Ala Ile Gln Tyr				
	115	120	125	
atc gag cgc ctc cag gcc ctg ctc agc tcc ctc aac cag gag gag cgt				432
Ile Glu Arg Leu Gln Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Gln Glu Glu Arg				
	130	135	140	
gac ctc cgc tac cgg ggc ggc ggc ggc ccc cag cca ggg gtg ccc agc				480
Asp Leu Arg Tyr Arg Gly Gly Gly Gly Pro Gln Pro Gly Val Pro Ser				
	145	150	160	
gaa tgc agc tot cac agc gcc tcc tgc agt cca gag tgg ggc agt gca				528
Glu Cys Ser Ser His Ser Ala Ser Cys Ser Pro Glu Trp Gly Ser Ala				
	165	170	175	
ctg gag ttc ago gcc aac cca ggg gat cat ctg cto acg got gac cct				576
Leu Glu Phe Ser Ala Asn Pro Gly Asp His Leu Leu Thr Ala Asp Pro				
	180	185	190	
aca gat gcc cac aac ctg cac tcc ctc acc tcc atc gtg gac agc atc				624
Thr Asp Ala His Asn Leu His Ser Leu Thr Ser Ile Val Asp Ser Ile				

	195		200		205												
	aca	gtg	gaa	gat	gtg	tot	gtg	goc	ttc	oaa	gat	gaa	acc	atg	ccc	aac	672
	Thr	Val	Glu	Asp	Val	Ser	Val	Ala	Phe	Pro	Asp	Glu	Thr	Met	Pro	Asn	
		210					215						220				
	tag																675

5  
 <210> 14  
 <211> 224  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*;  
 <400> 14

Met	Glu	Leu	Tyr	Glu	Thr	Ser	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Gln	Glu	Pro	Arg	Phe	
1				5					10						15	
Tyr	Asp	Gly	Glu	Asn	Tyr	Leu	Pro	Val	His	Leu	Gln	Gly	Phe	Glu	Pro	
		20						25					30			
Pro	Gly	Tyr	Glu	Arg	Thr	Glu	Leu	Thr	Leu	Ser	Pro	Glu	Ala	Pro	Gly	
		35					40						45			
Pro	Leu	Glu	Asp	Lys	Gly	Leu	Gly	Thr	Pro	Glu	His	Cys	Pro	Gly	Gln	
	50					55					60					
Cys	Leu	Pro	Trp	Ala	Cys	Lys	Val	Cys	Lys	Arg	Lys	Ser	Val	Ser	Val	
65					70					75					80	
Asp	Arg	Arg	Arg	Ala	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Lys	Arg	Arg	Leu	Lys	Lys	
				85					90					95		
Val	Asn	Glu	Ala	Phe	Glu	Ala	Leu	Lys	Arg	Ser	Thr	Leu	Leu	Asn	Pro	
					100				105					110		
Asn	Gln	Arg	Leu	Pro	Lys	Val	Glu	Ile	Leu	Arg	Ser	Ala	Ile	Gln	Tyr	
			115				120					125				

10

Ile Glu Arg Leu Gln Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Gln Glu Glu Arg  
 130 135 140

Asp Leu Arg Tyr Arg Gly Gly Gly Gly Pro Gln Pro Gly Val Pro Ser  
 145 150 155 160

Glu Cys Ser Ser His Ser Ala Ser Cys Ser Pro Glu Trp Gly Ser Ala  
 165 170 175

Leu Glu Phe Ser Ala Asn Pro Gly Asp His Leu Leu Thr Ala Asp Pro  
 180 185 190

Thr Asp Ala His Asn Leu His Ser Leu Thr Ser Ile Val Asp Ser Ile  
 195 200 205

Thr Val Glu Asp Val Ser Val Ala Phe Pro Asp Glu Thr Met Pro Asn  
 210 215 220

- 5 <210> 15  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>  
 <223> cebador directo SRY  
 <400> 15  
 gcctcaggac atattaatct ctggag 26
- 15 <210> 16  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>  
 <223> cebador inverso SRY  
 <400> 16  
 gctgatctct gaattctgca tgc 23
- 25 <210> 17  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>  
 <223> sonda SRY  
 <400> 17  
 aggcgcaagt tggctcaaca gaatcc 26
- 35 <210> 18

<211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> cebador directo IL2  
 <400> 18  
 gcctgtgtg ttataagtag gaggc 25  
 10 <210> 19  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> cebador inverso IL2  
 <400> 19  
 20 agtgccaatt cgatgatgag c 21  
 <210> 20  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sonda IL2  
 30 <400> 20  
 tctcctcaga aattcacca cagtgctg 29

**REIVINDICACIONES**

1. Una estructura tridimensional aplicable al corazón, que comprende una célula madre mesenquimatosa derivada de una parte distinta al miocardio de un adulto,  
 5 donde la estructura tridimensional se puede obtener mediante un método que comprende las etapas de:
- a) cultivar la célula madre mesenquimatosa derivada de la parte distinta al miocardio de un adulto sobre un soporte de cultivo celular injertado con una macromolécula respondedora a la temperatura que tiene una temperatura de solución crítica límite superior o una temperatura de solución crítica límite inferior con el agua de  
 10 0 °C a 80 °C;  
 b) fijar una temperatura media del cultivo a la temperatura de la solución del límite superior o más o a la temperatura de la solución del límite inferior o menos; y  
 c) desprender la célula cultivada como una estructura tridimensional.
- 15 2. La estructura de acuerdo con la reivindicación 1, donde la célula derivada de una parte distinta al miocardio es una célula no derivada del corazón.
3. La estructura de acuerdo con la reivindicación 1, donde la aplicabilidad al corazón incluye la aplicabilidad al miocardio.  
 20
4. La estructura de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una lámina de células en monocapa.
5. La estructura de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una lámina de células en multicapa.
- 25 6. La estructura de acuerdo con la reivindicación 5, donde la lámina de células en multicapas tiene conexión biológica.
7. La estructura de acuerdo con la reivindicación 6, donde la conexión biológica se selecciona del grupo que consiste en la conexión mediante la matriz extracelular, la conexión eléctrica y la conexión sin armazón.  
 30
8. El medicamento, que comprende una estructura tridimensional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en insuficiencia cardíaca, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, miocardiopatía, miocarditis, miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía hipertrófica en fase dilatada y miocardiopatía dilatada.  
 35
10. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 9, donde la célula deriva del sujeto al que se aplica la estructura.  
 40
11. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 9, donde la célula no deriva del sujeto al que se aplica la estructura.
- 45 12. Un método para producir una estructura tridimensional aplicable al corazón, que comprende una célula madre mesenquimatosa derivada de una parte distinta al miocardio de un adulto, comprendiendo el método las etapas de:
- a) cultivar la célula madre mesenquimatosa derivada de la parte distinta al miocardio de un adulto sobre un soporte de cultivo celular injertado con una macromolécula respondedora a la temperatura que tiene una temperatura de solución crítica límite superior o una temperatura de solución crítica límite inferior con el agua de  
 50 0 °C a 80 °C;  
 b) fijar una temperatura media del cultivo a la temperatura de la solución del límite superior o más o a la temperatura de la solución del límite inferior o menos; y  
 c) desprender la célula cultivada como una estructura tridimensional.  
 55
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, donde antes de la etapa de desprendimiento se añade ácido ascórbico o un derivado del mismo.
- 60 14. El método de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, donde durante o antes de la etapa de desprendimiento no se realiza un tratamiento usando una enzima de degradación de proteínas.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, donde la macromolécula respondedora a la temperatura es poli(N-isopropilacrilamida).

**FIG.1A Construcciones de láminas celulares**

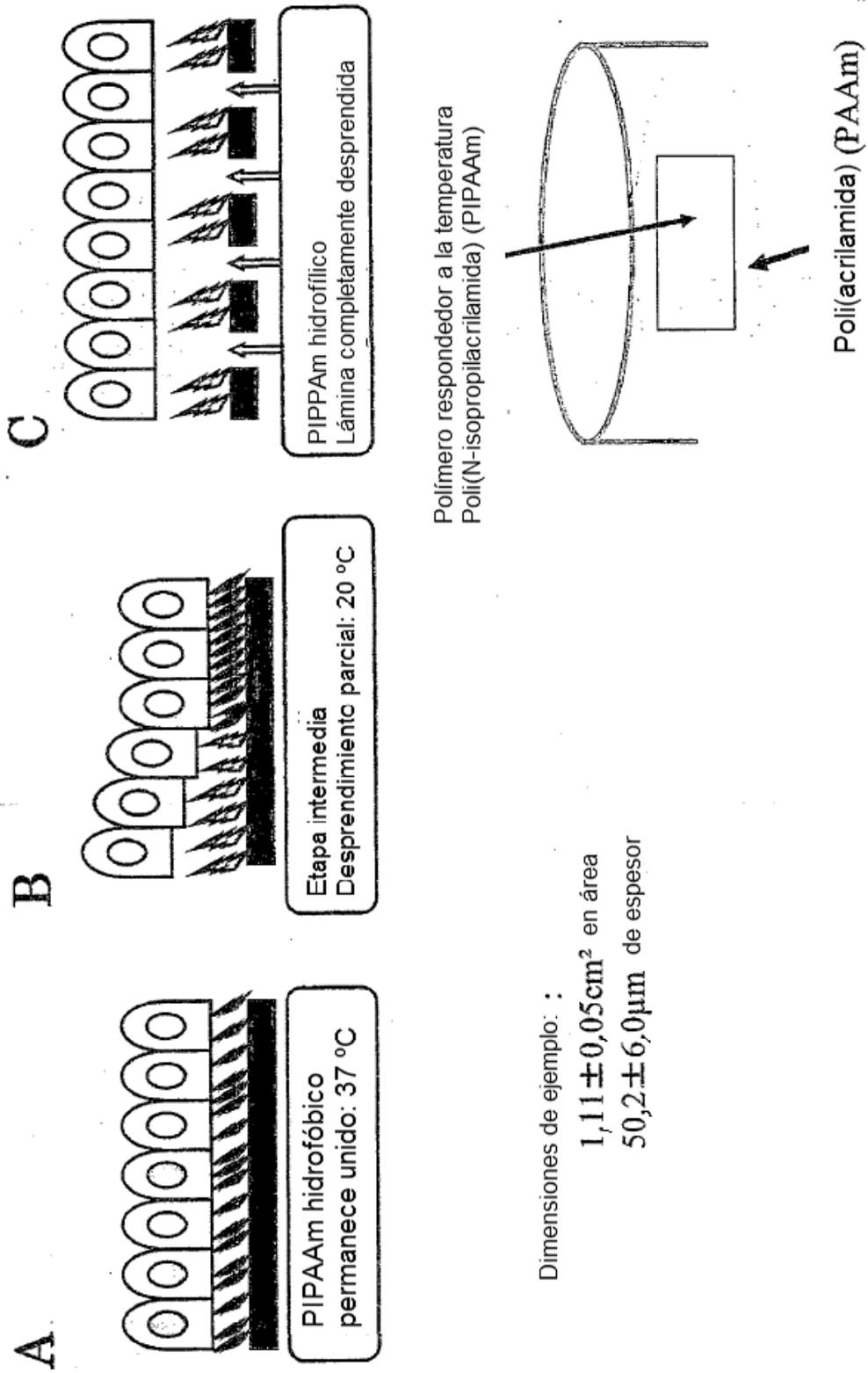
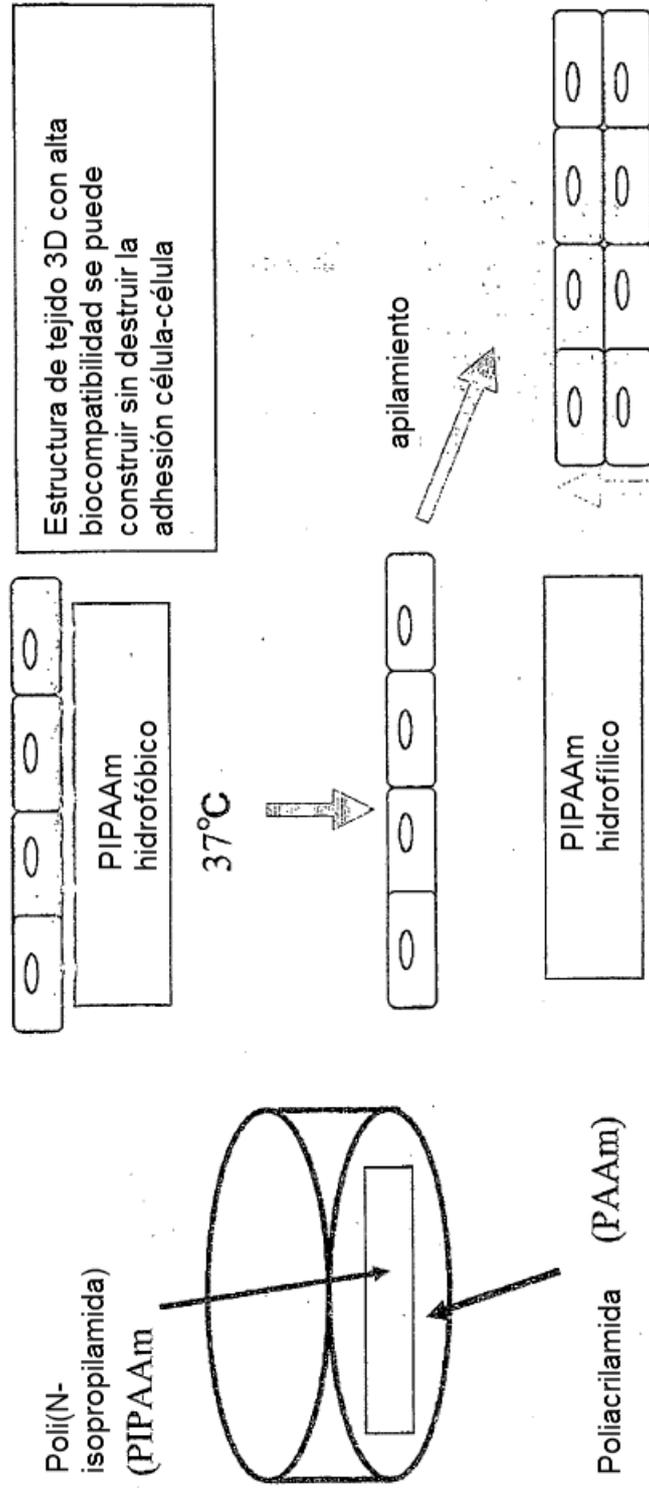


FIG.1B

Placa de cultivo respondedora a la temperatura



32°C o menos: desprendido como lámina

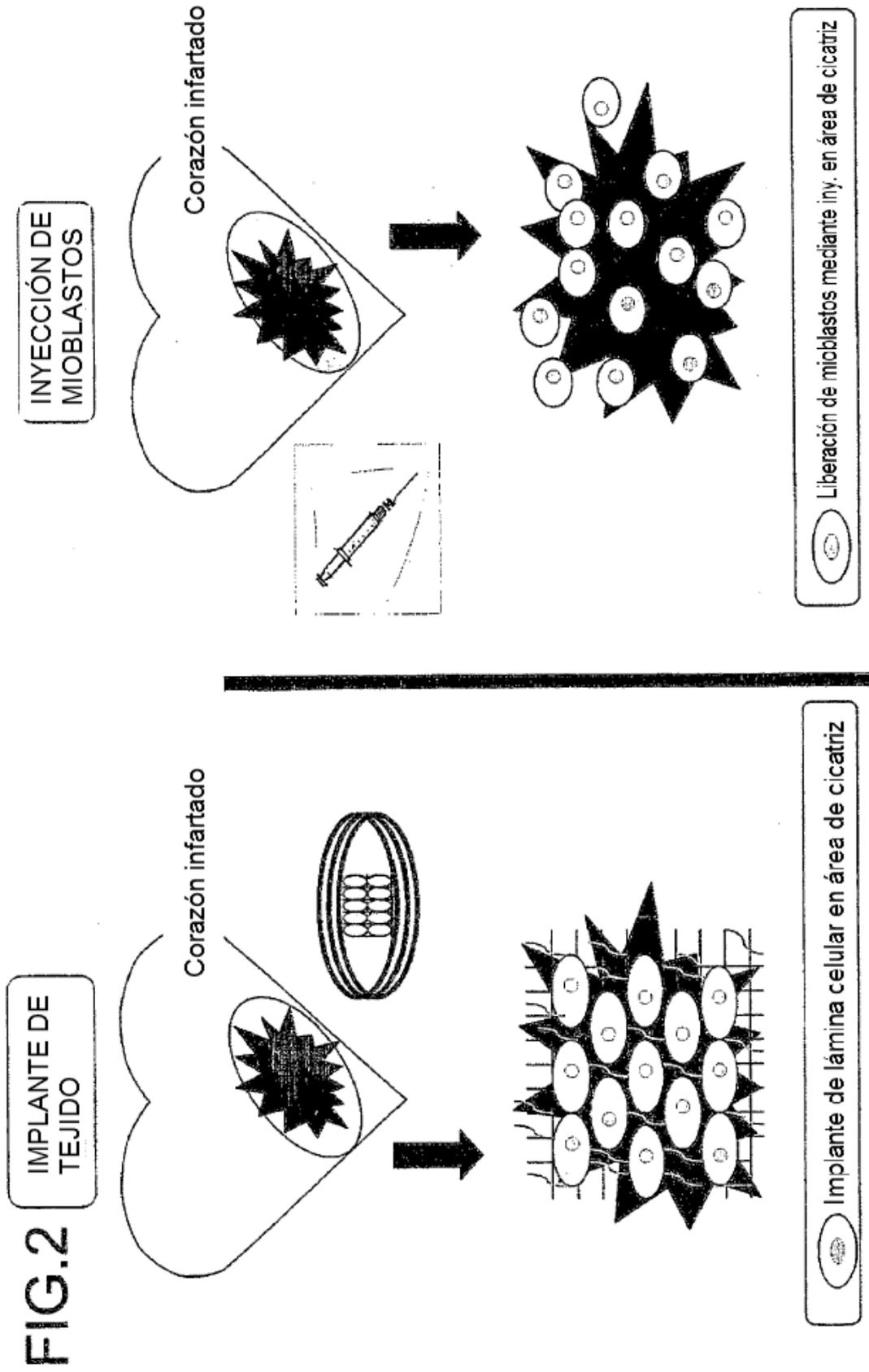
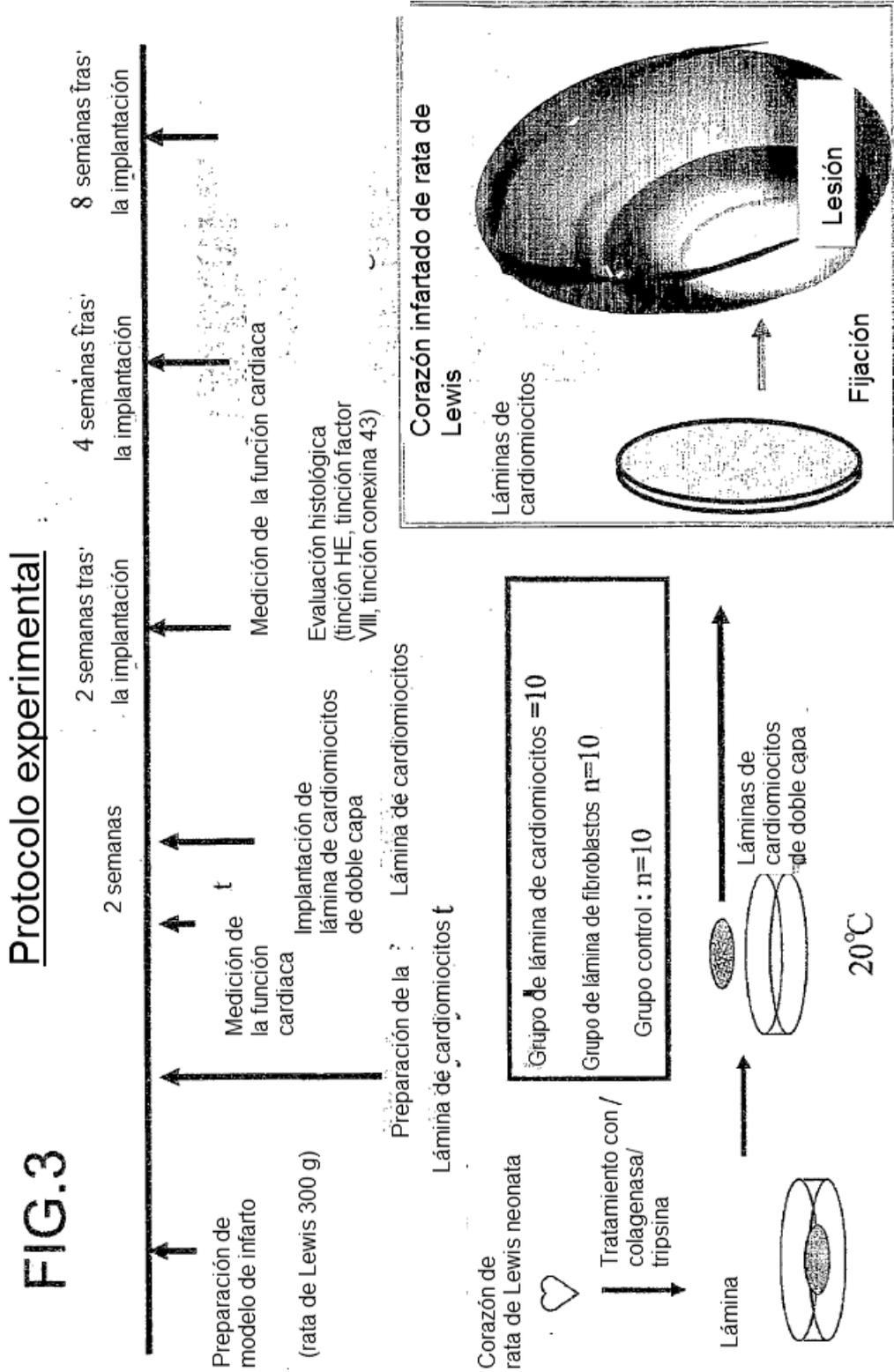
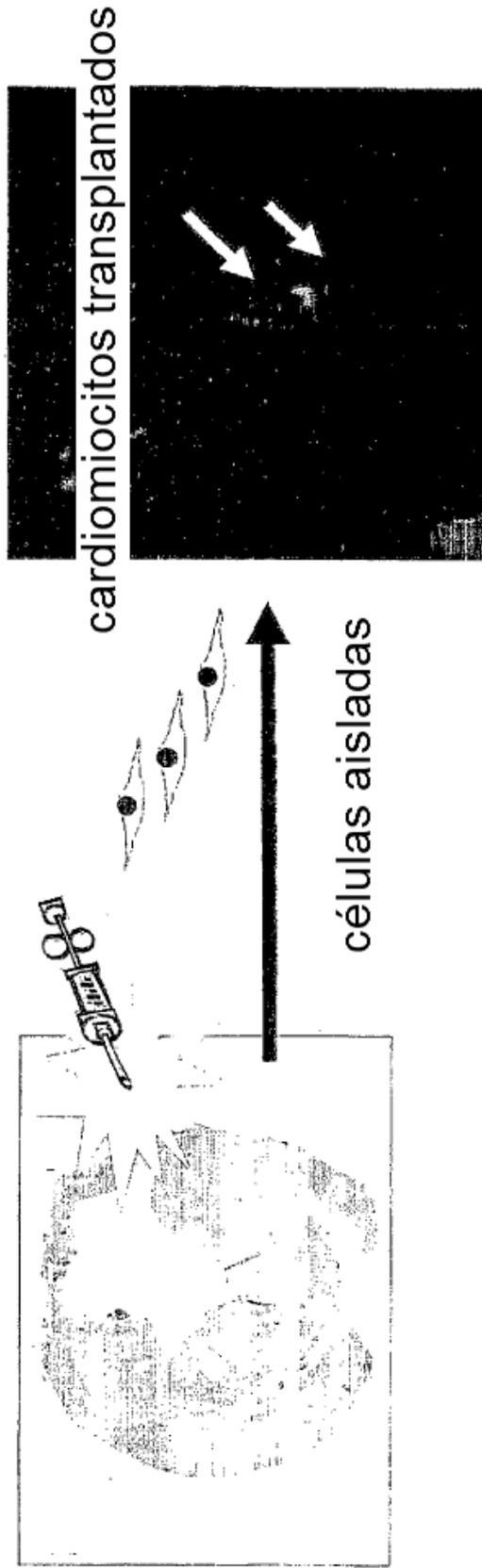


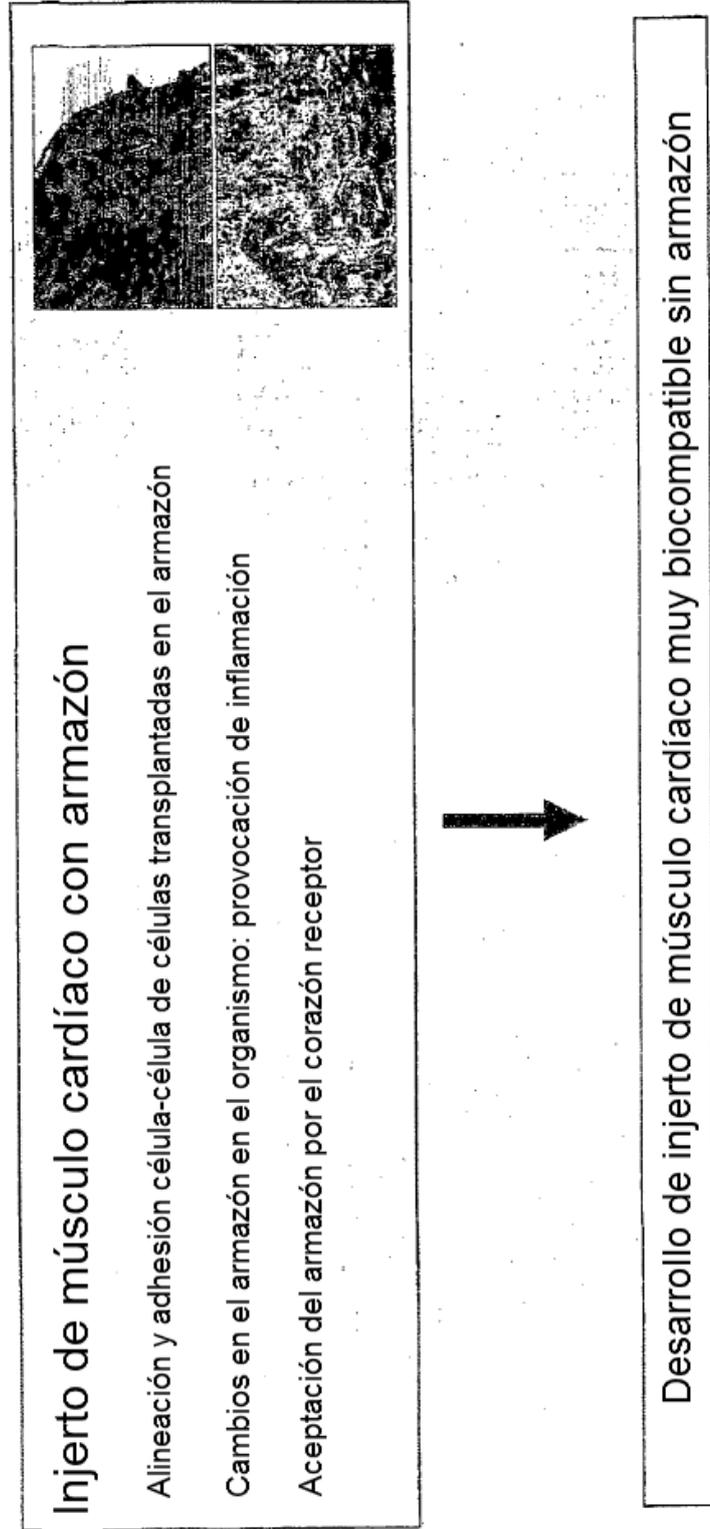
FIG.2



**FIG.4**  
Terapia regenerativa para el músculo  
cardíaco mediante trasplante celular



**FIG.5 Problemas con el trasplante de tejido**



**FIG.6**

Implantación de lámina de cardiomiocitos en corazón infartado

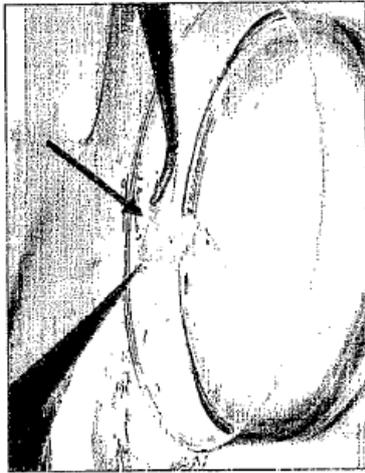


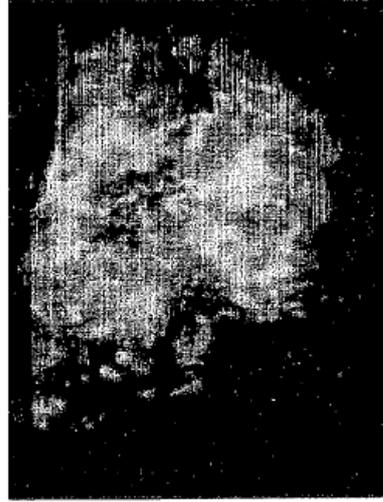
Lámina de cardiomiocitos

Implantación en modelo de infarto en ratas



*In vitro*

Implantación de lámina de cardiomiocitos de rata neonata en GFP



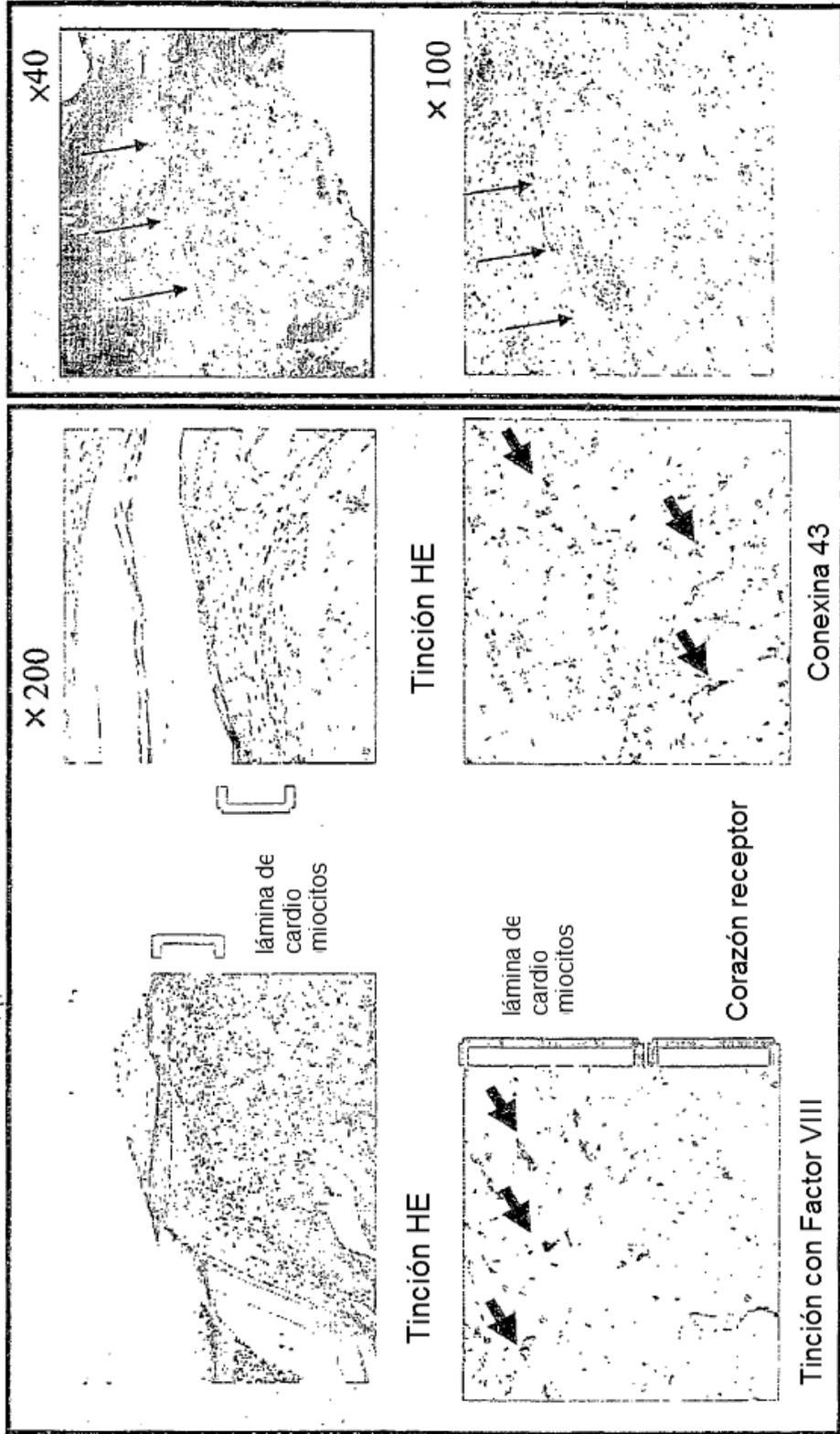
*In vivo*

**FIG.7**

Tejido

2 semanas tras la implantación

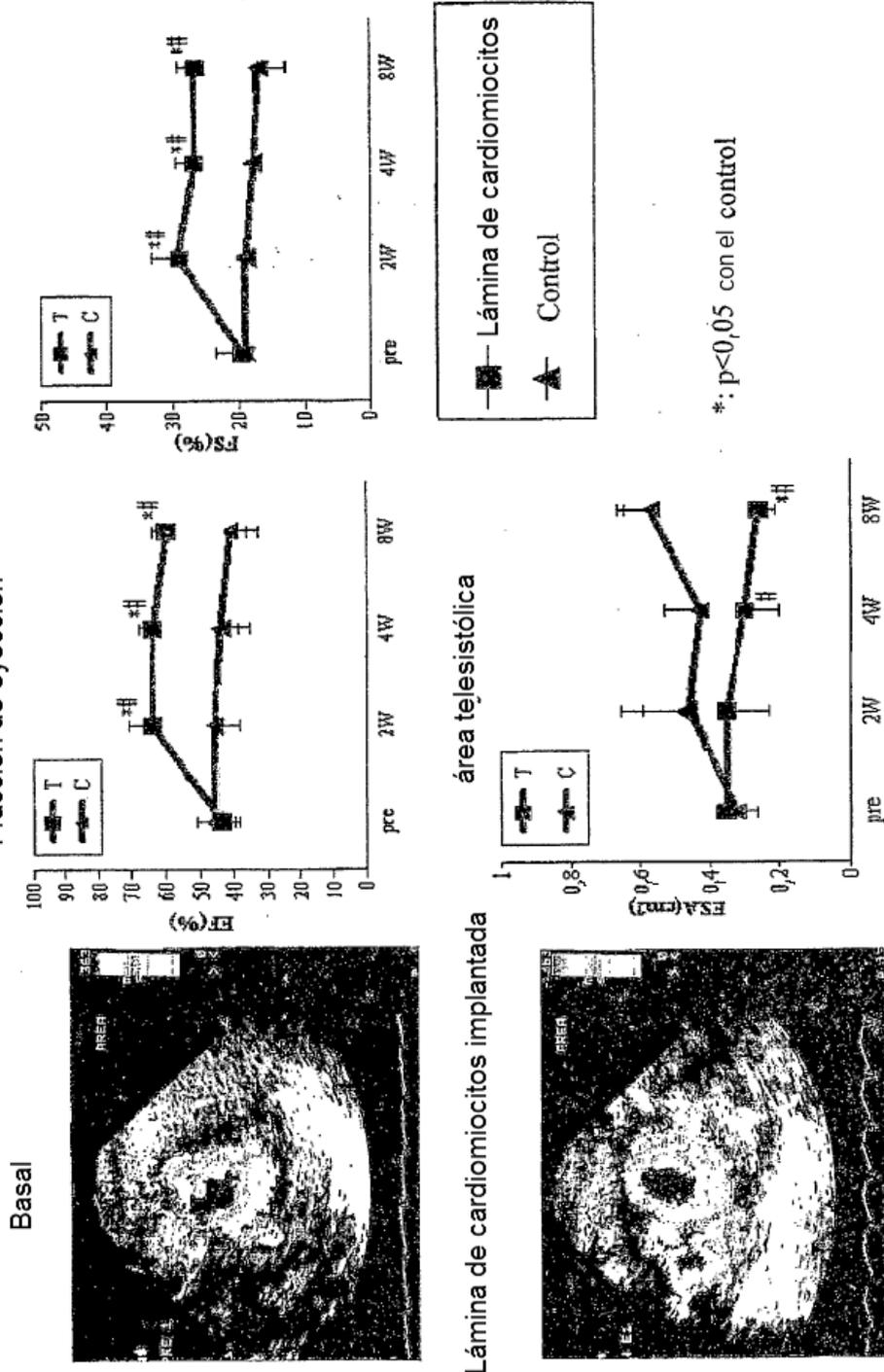
8 semanas tras la implantación



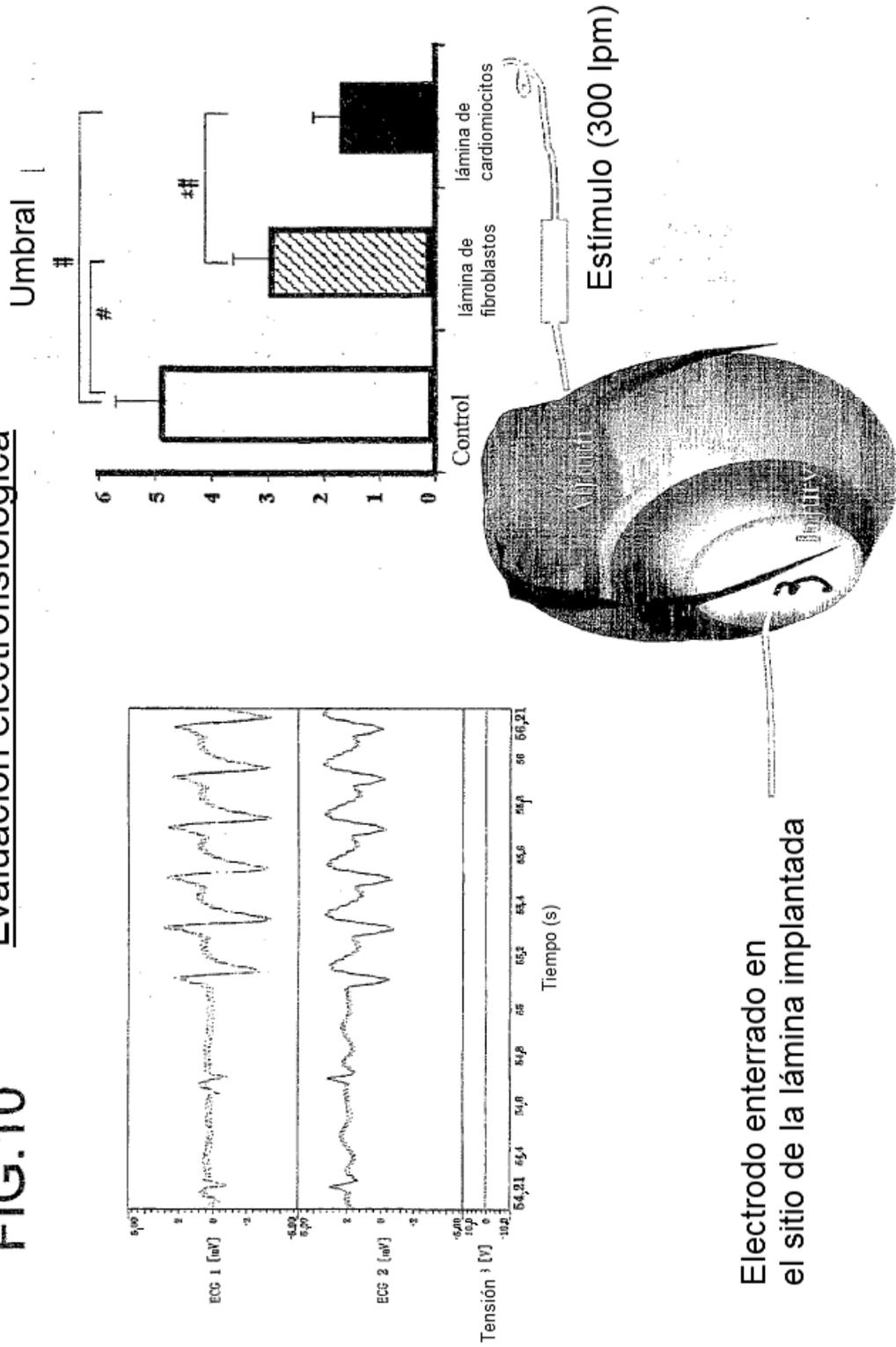


**Evaluación de la función cardíaca-2**

**FIG.9**

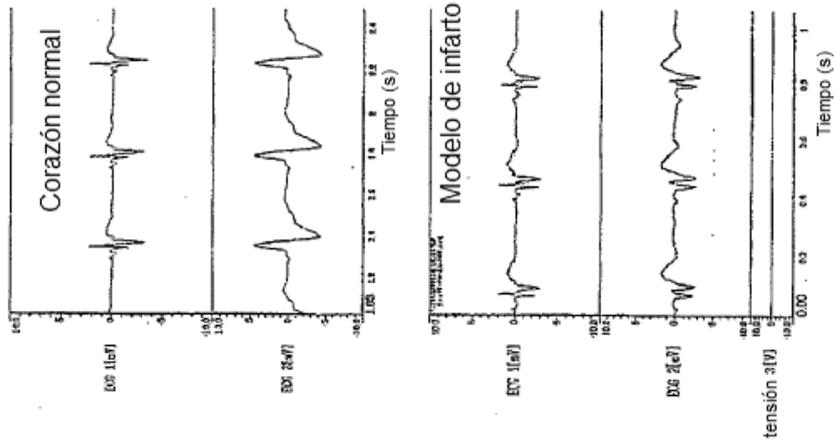


**FIG.10** Evaluación electrofisiológica



**FIG.11**

**Evaluación electrofisiológica**



**ECG 1:ECG (Superficie)**

**ECG 2:** Corazón normal (pared anterior)  
 Modelo de ligadura (dañado)  
 Tejido protésico implantado  
 (tejido protésico dañado)

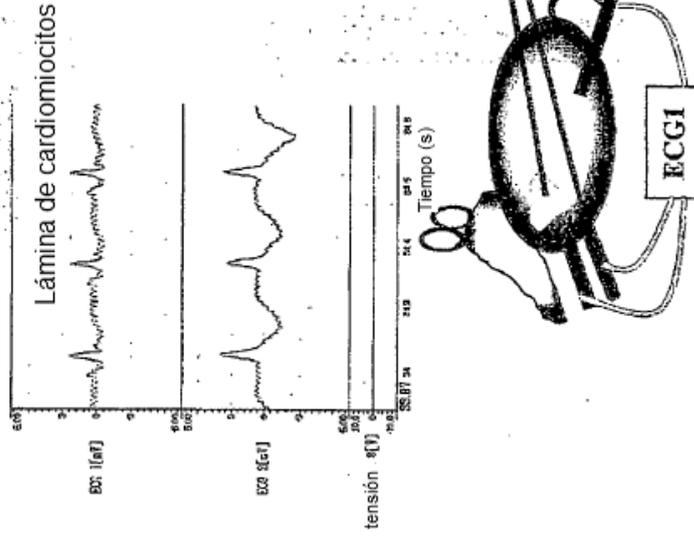
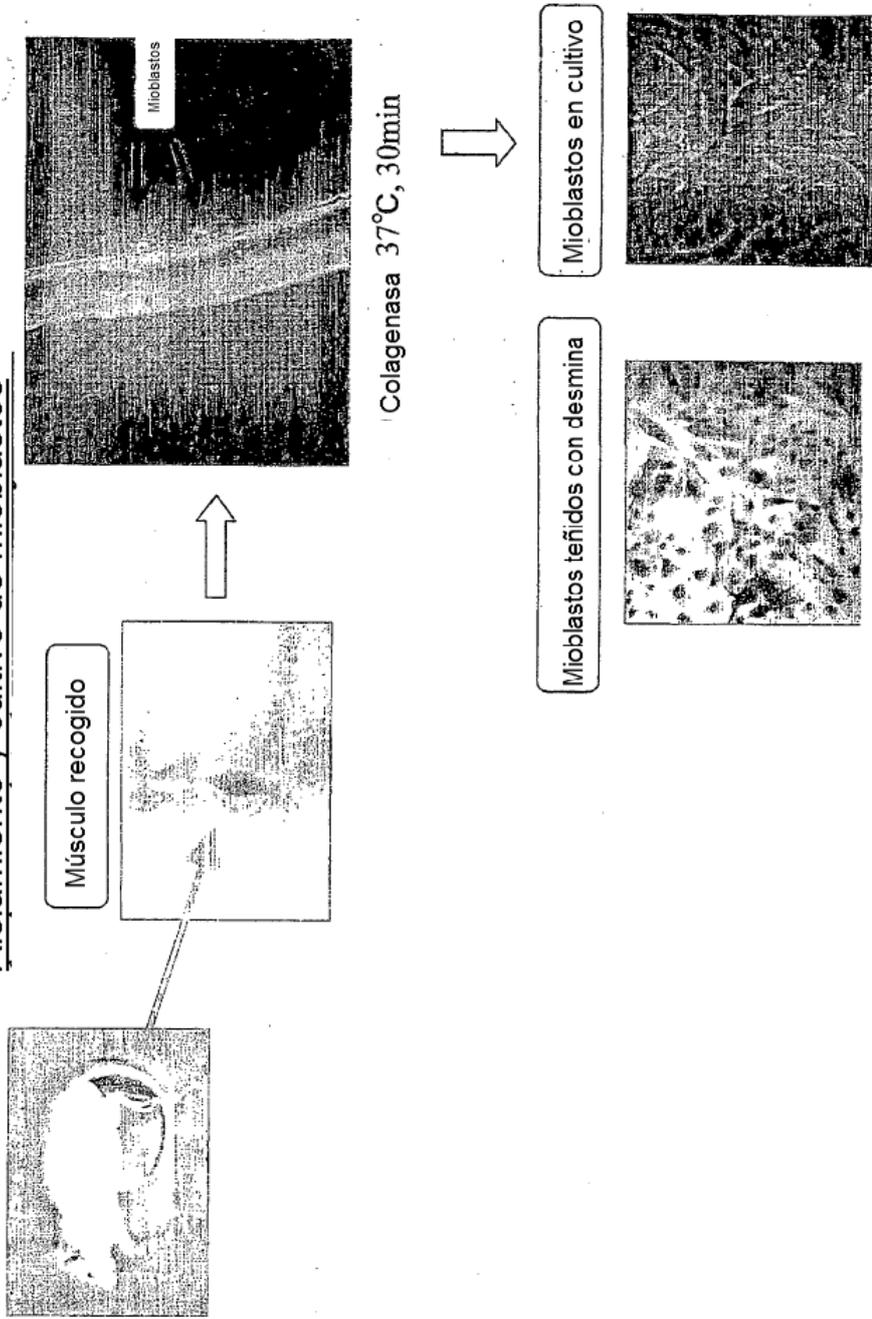


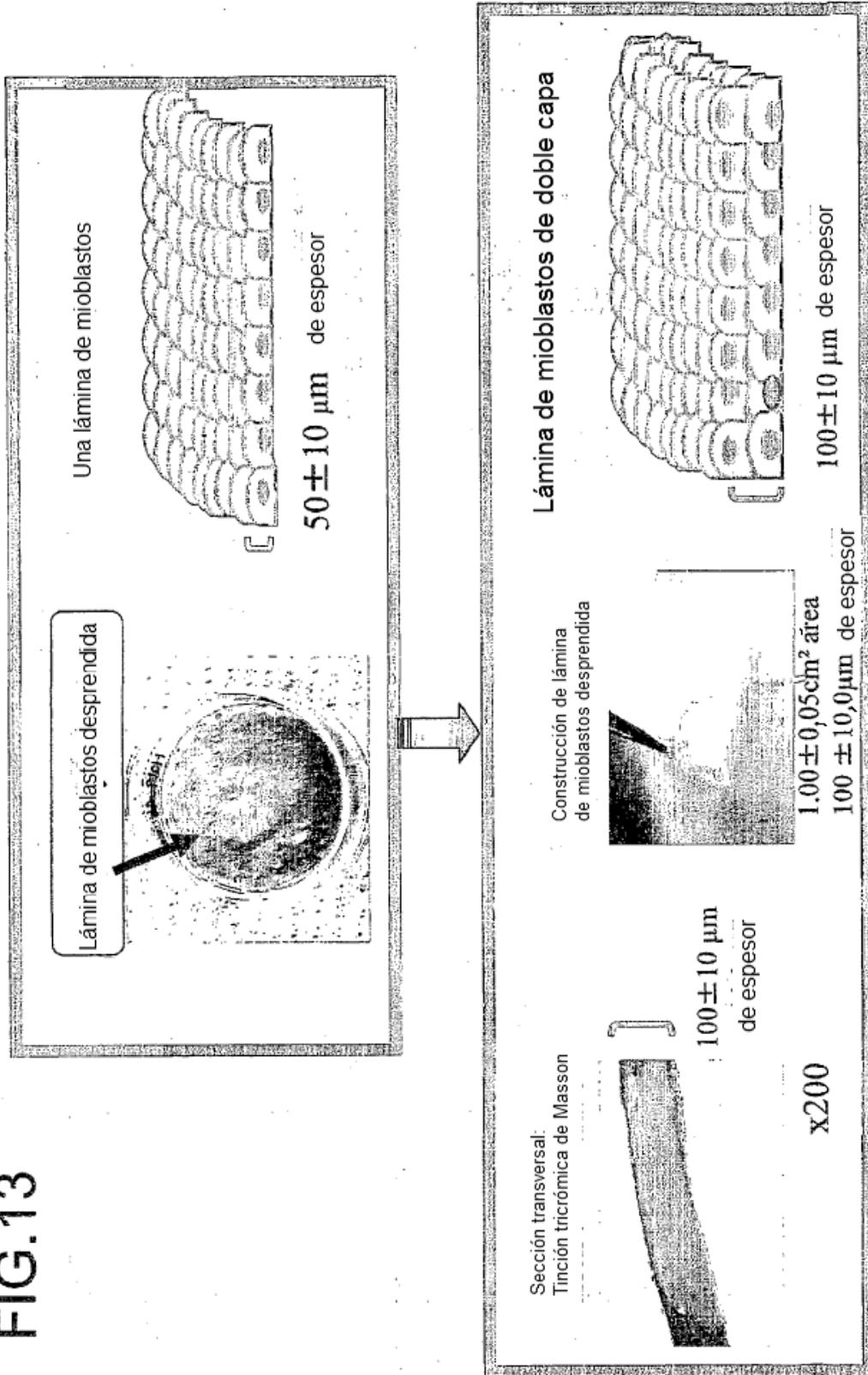
FIG.12

Aislamiento y cultivo de mioblastos



Métodos; Construcción de lámina de mioblastos

**FIG.13**



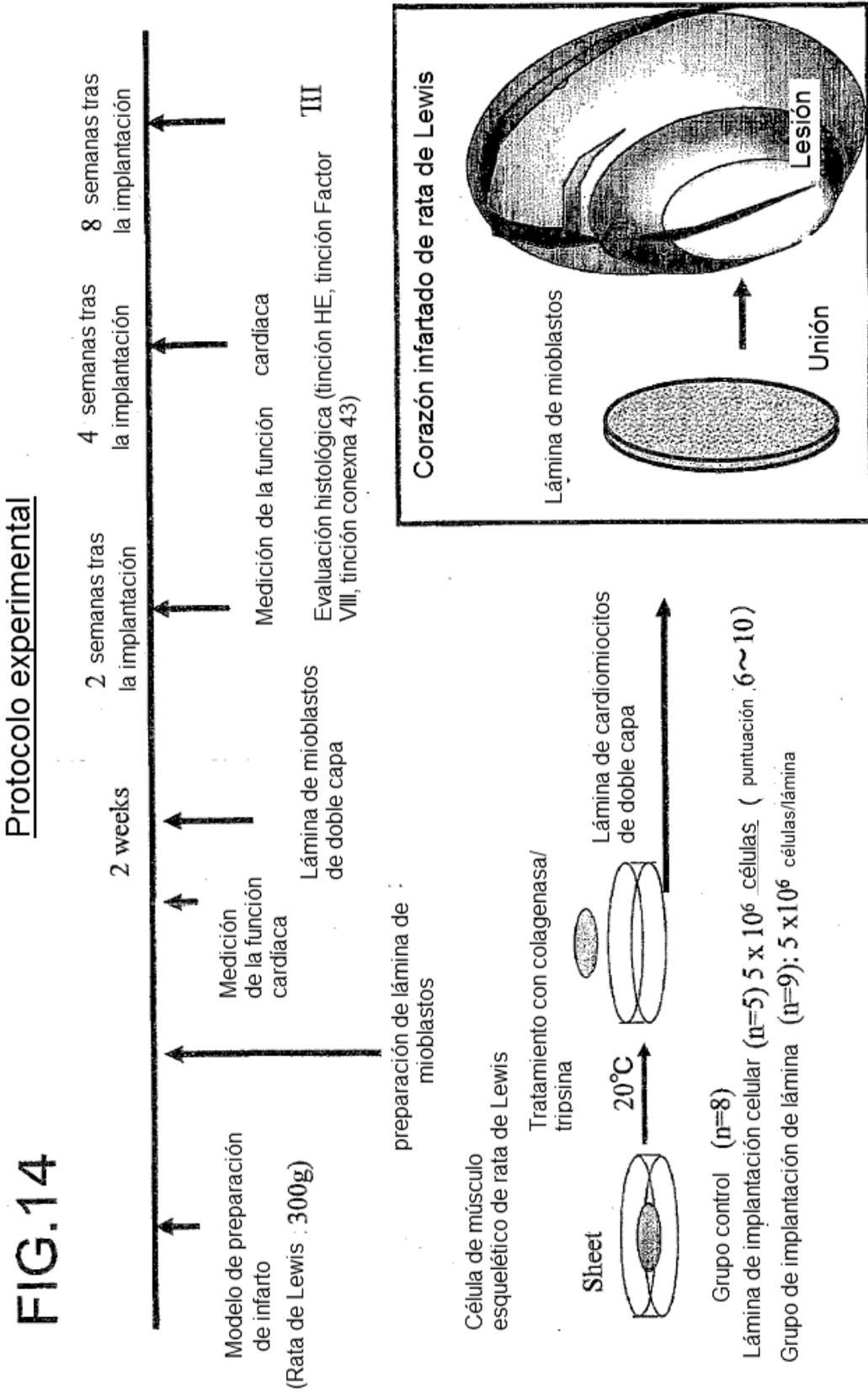
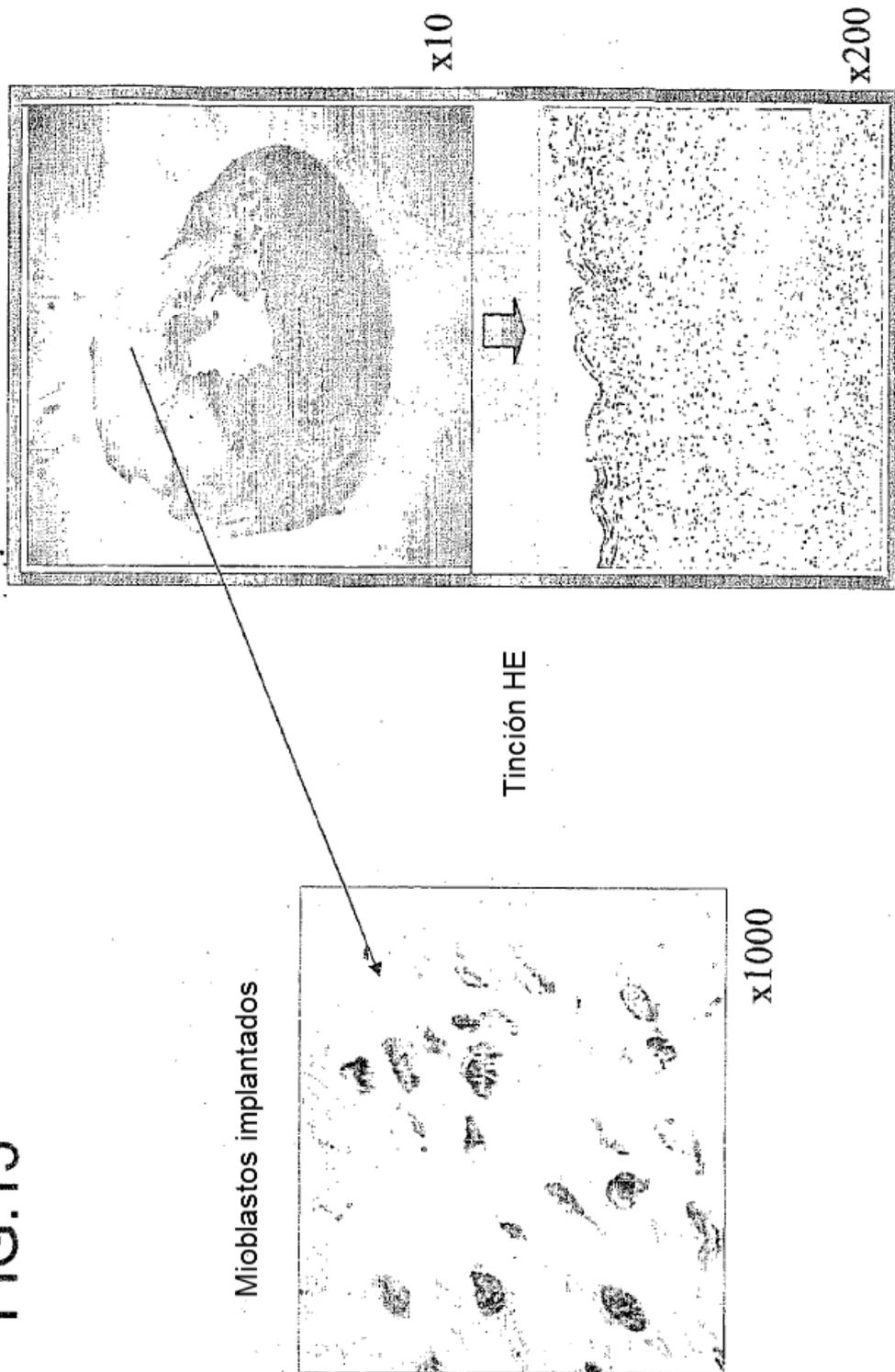
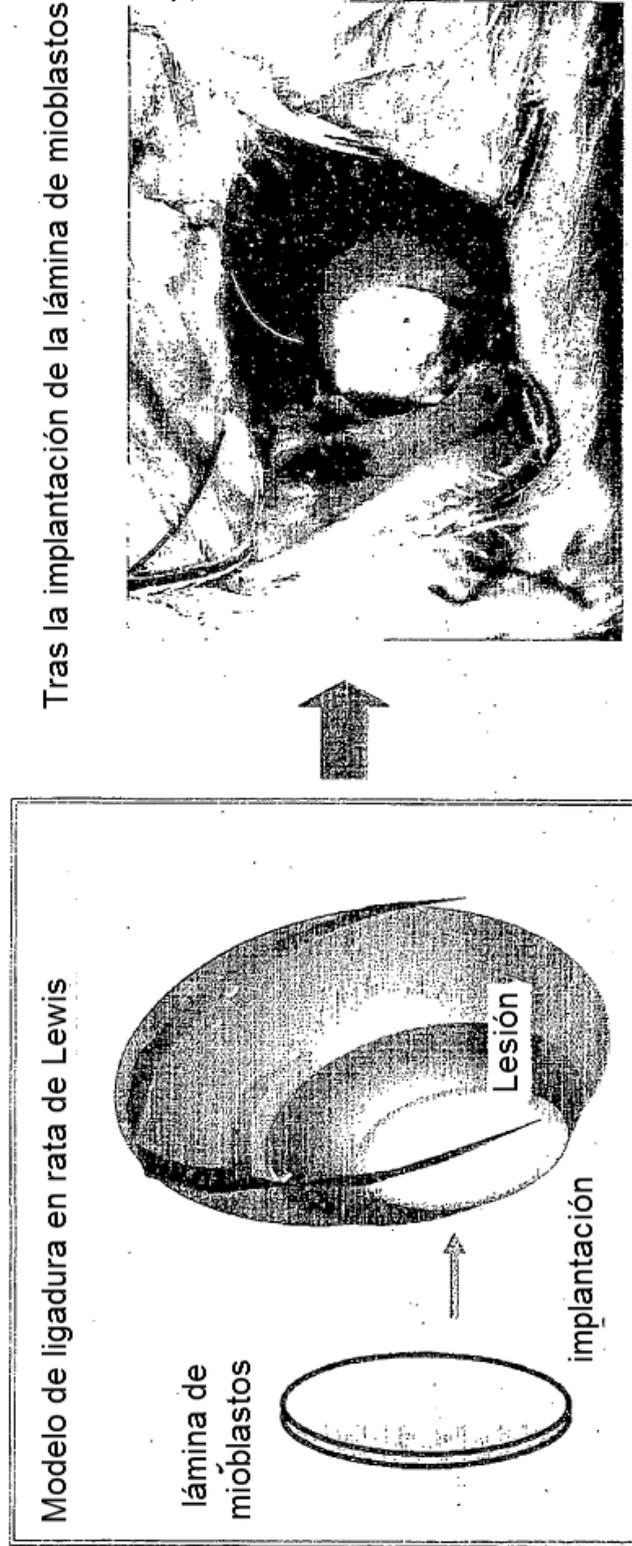


Lámina de mioblastos: 4S tras la implantación

**FIG.15**

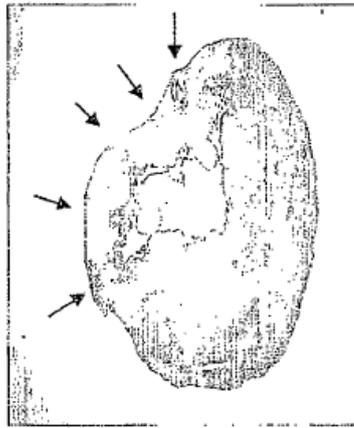


**FIG.16** Procedimiento de implantación de lámina de mioblastos



# FIG.17 Histología, Tinción tricrómica de Masson

Grupo de tejido protésico de mioblastos  
4 S después



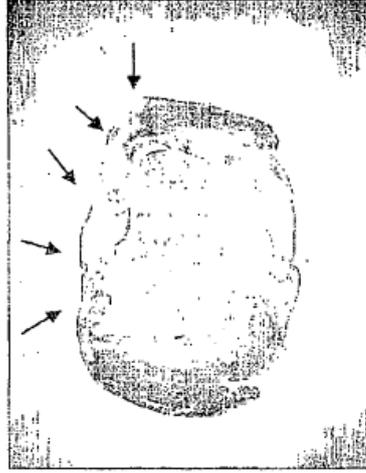
x10

Grupo de inyección de mioblastos  
4 S después



x10

Grupò control  
4 S después



x10



x200



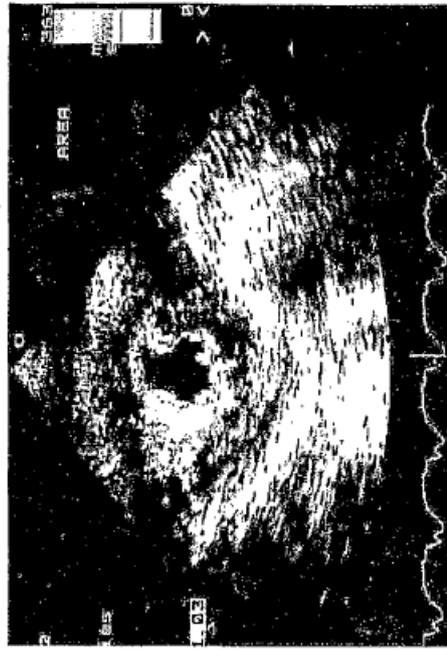
x40



x40

FIG.18

CKA



Análisis en modo M

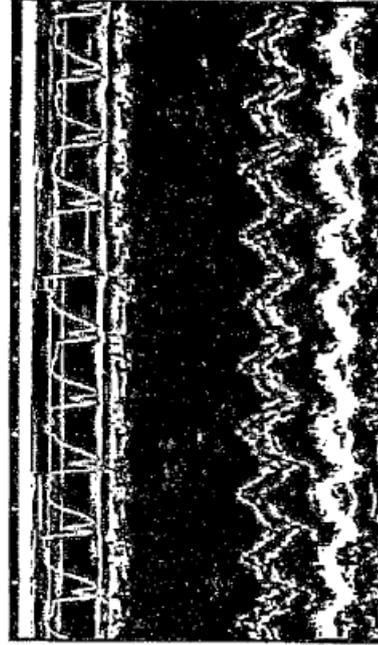
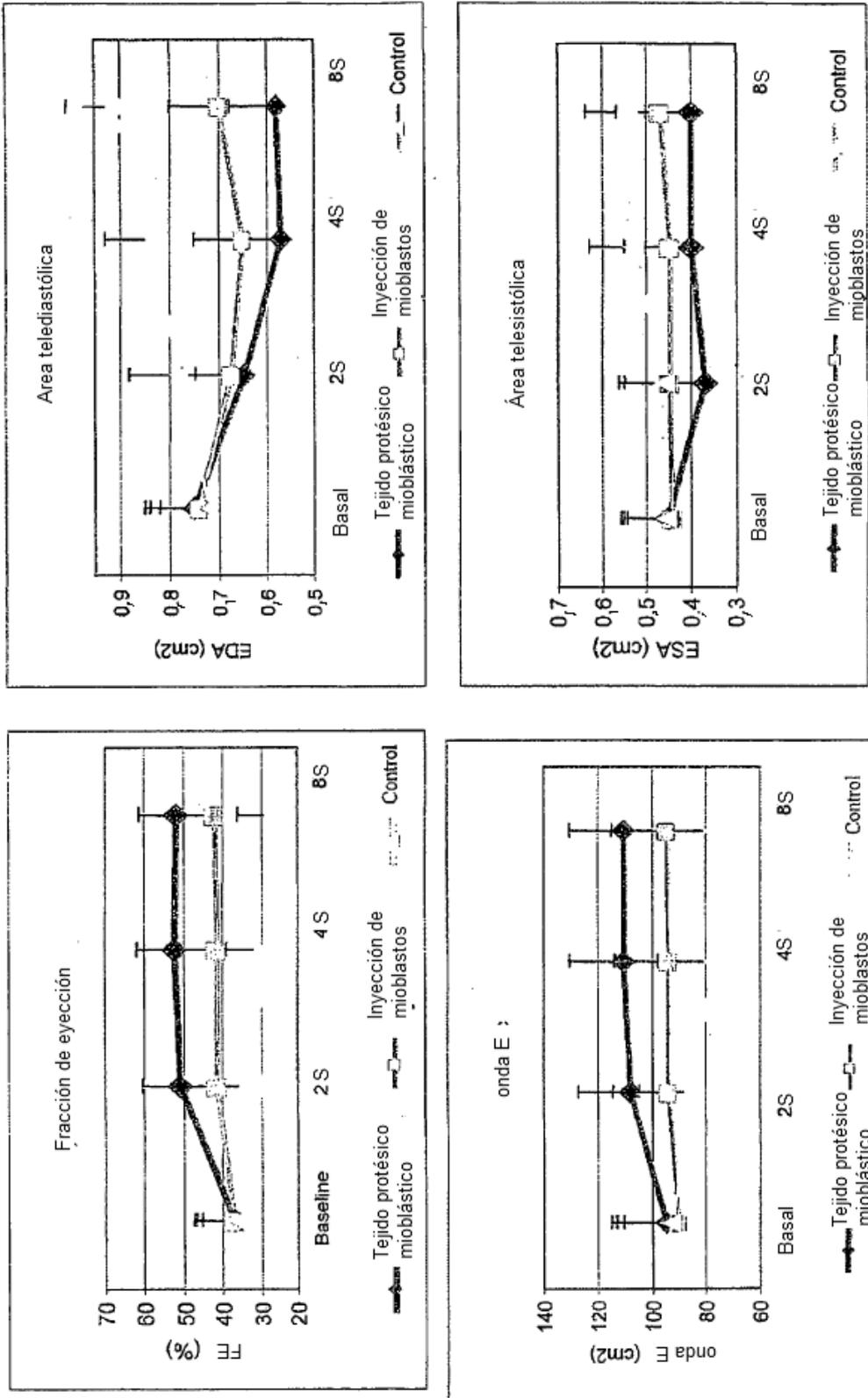


FIG.19



#P < 0,05 para el control; \*P < 0,05 para el grupo de inyección con aguja



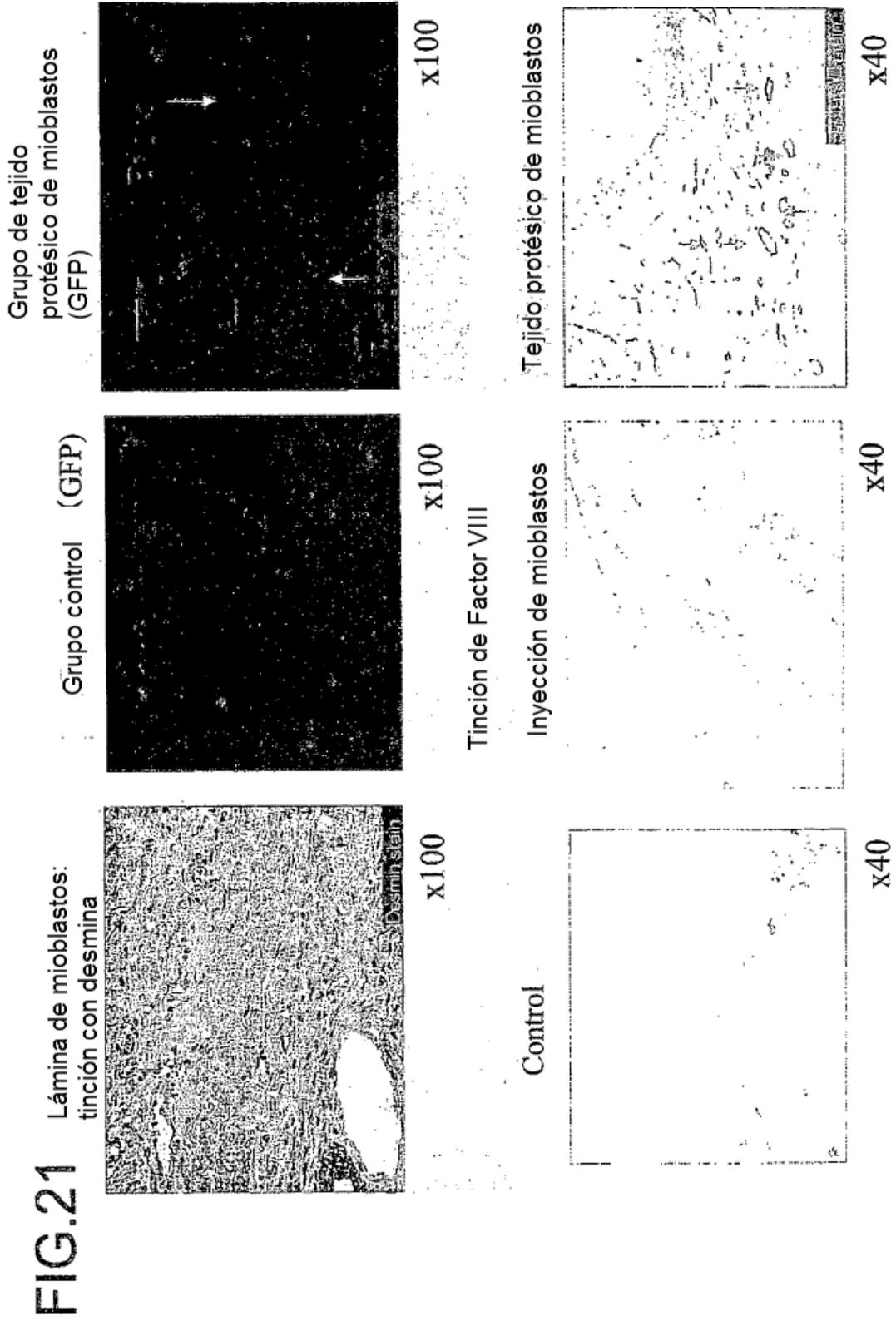


FIG.22A

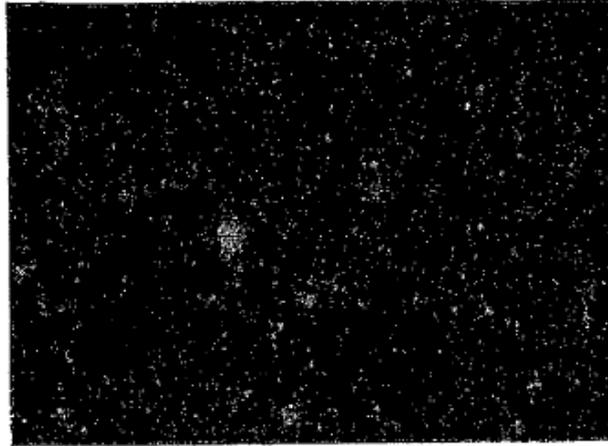


FIG.22B

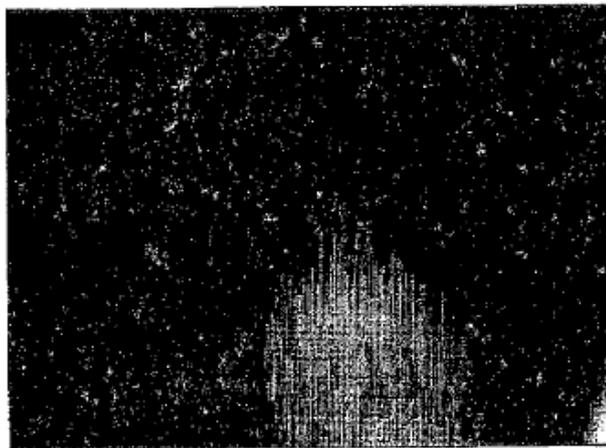


FIG.22C

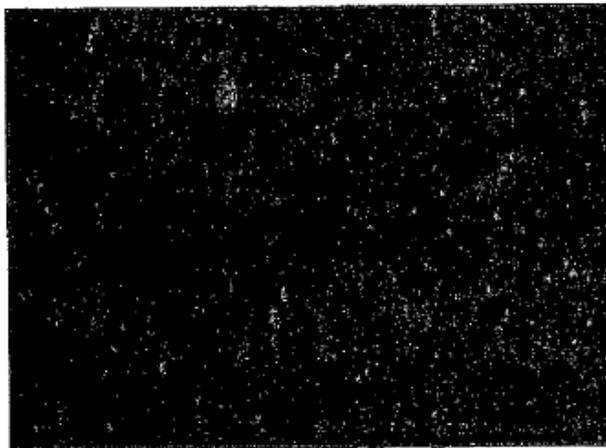


FIG.22D

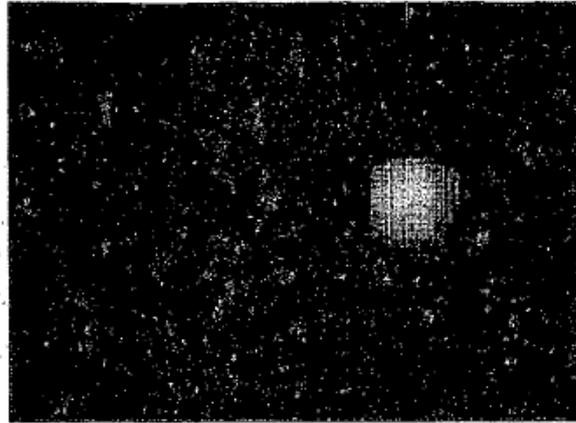


FIG.22E



FIG.22F



FIG.23A

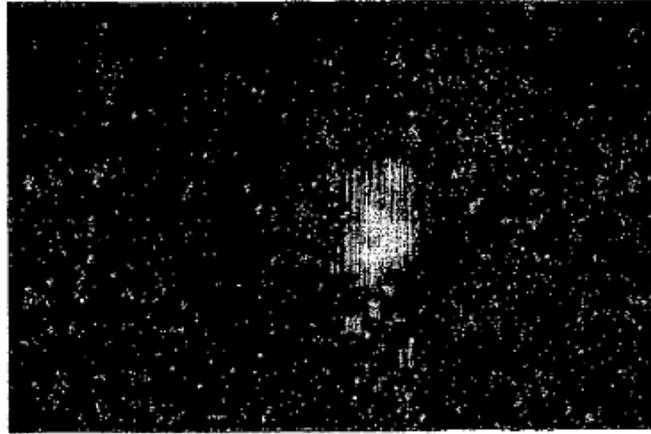


FIG.23B

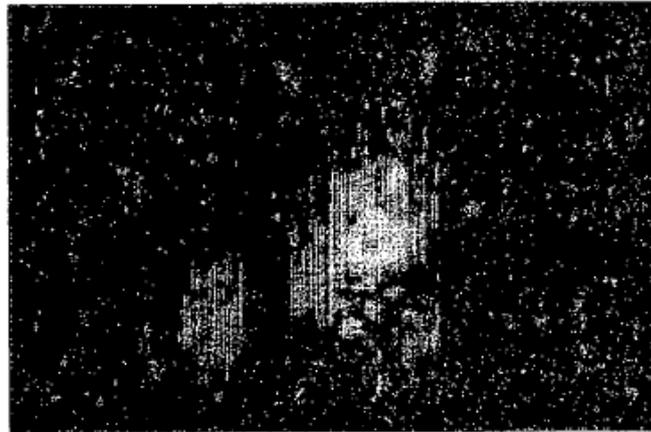


FIG.23C

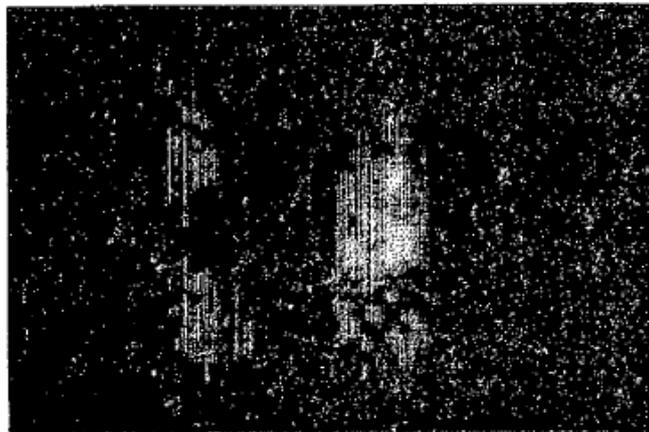


FIG.24A

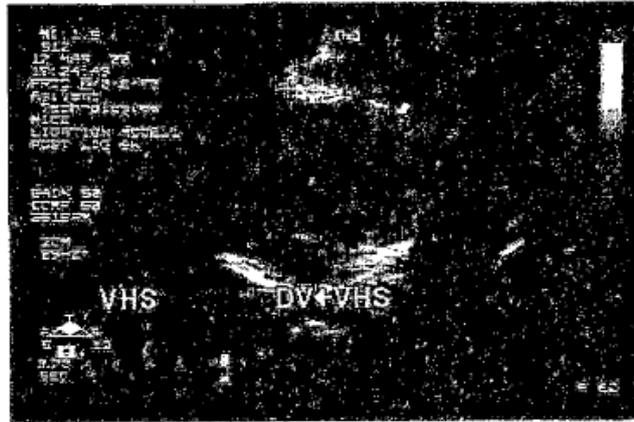


FIG.24B

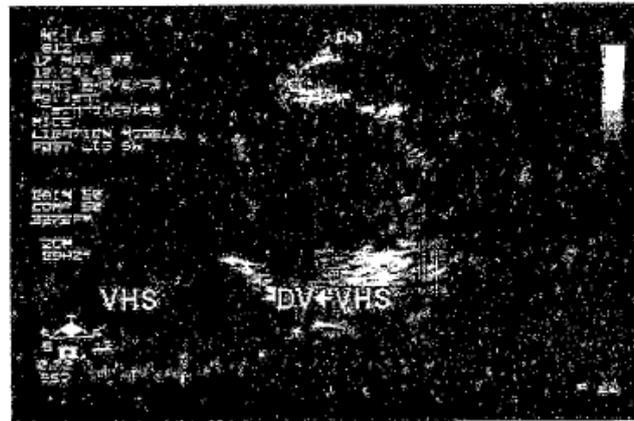


FIG.24C

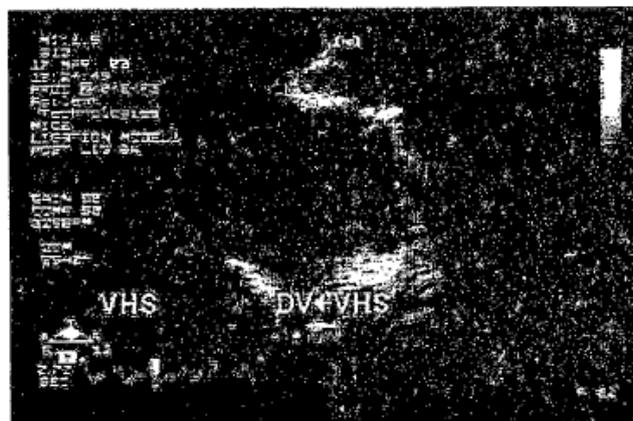


FIG.25A

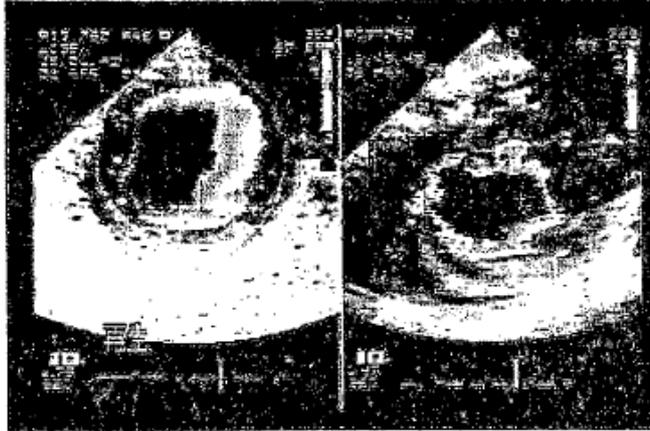


FIG.25B

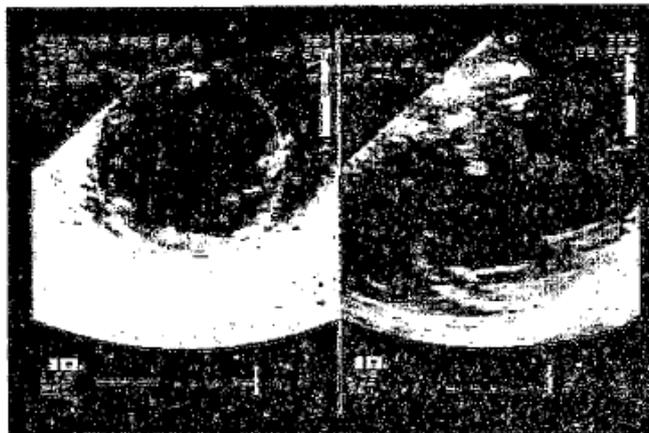


FIG.25C



FIG.26A

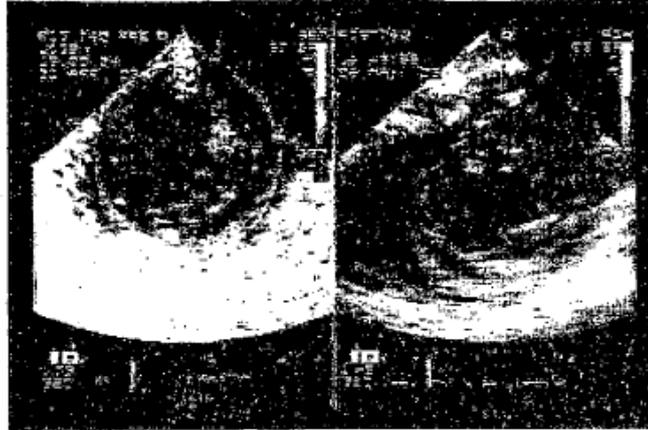


FIG.26B



FIG.26C



FIG.27A

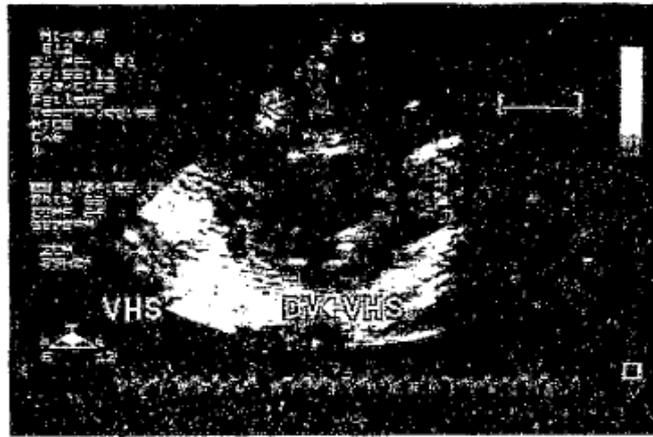


FIG.27B

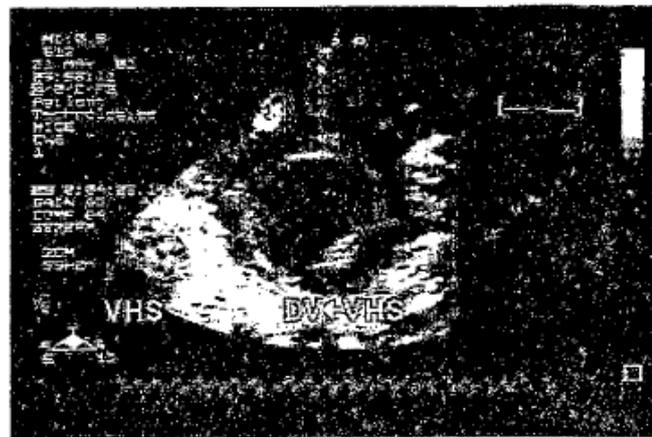


FIG.27C

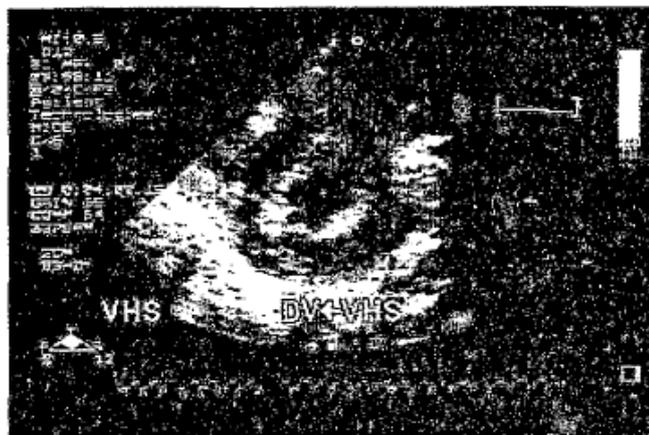
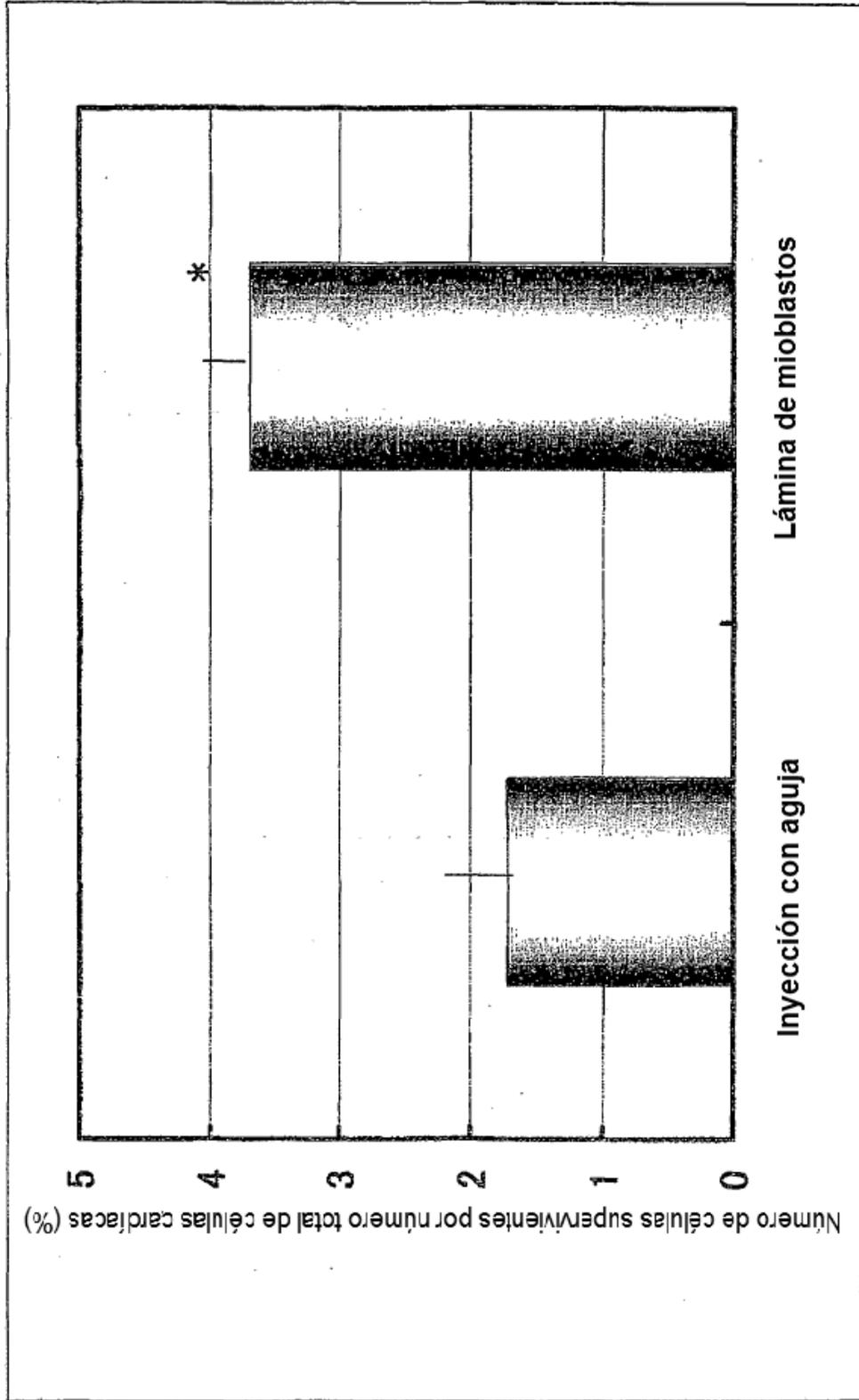
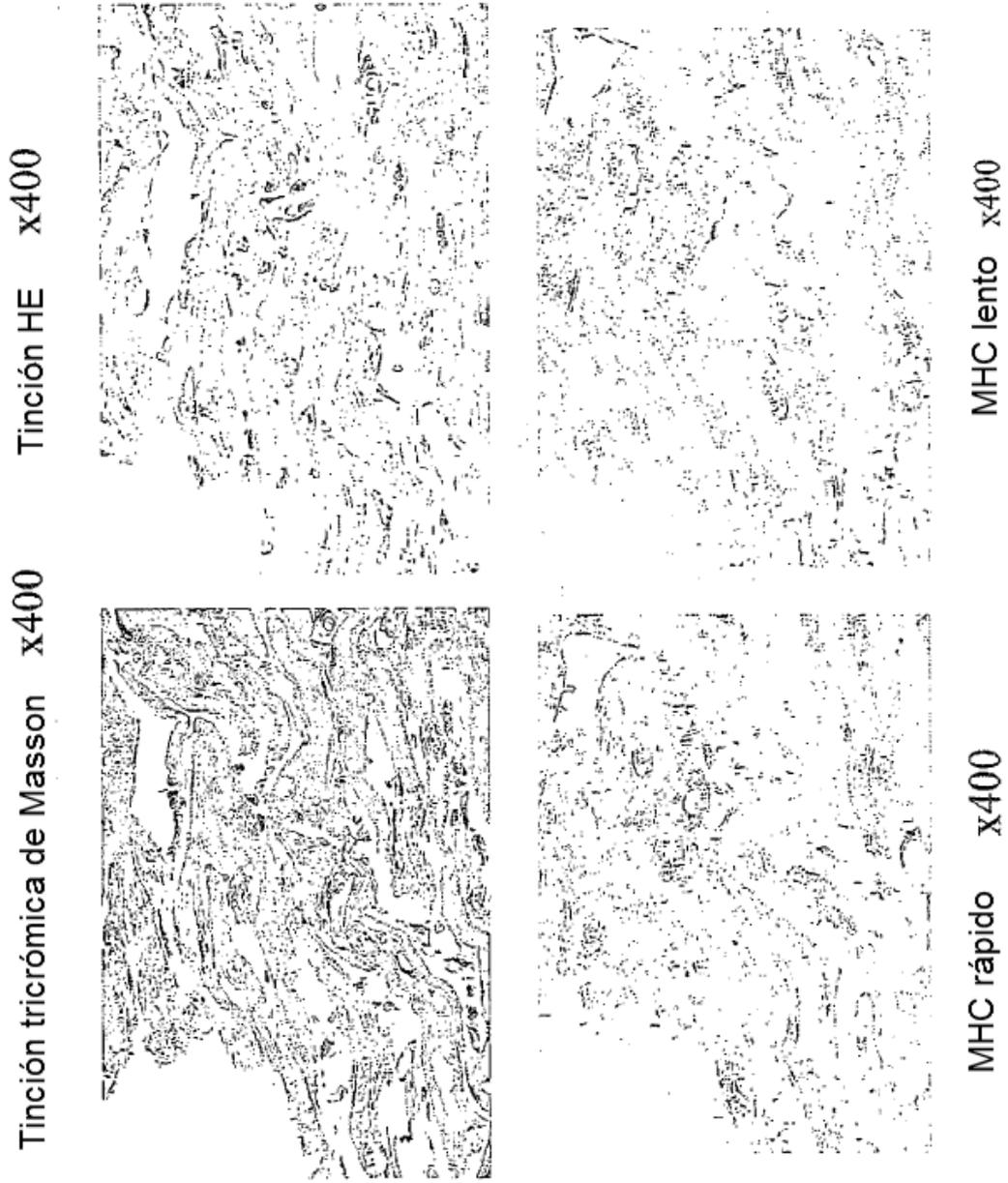


FIG.28



**FIG.29**



**FIG.30A** Tejido (tinción tricrómica de Masson)

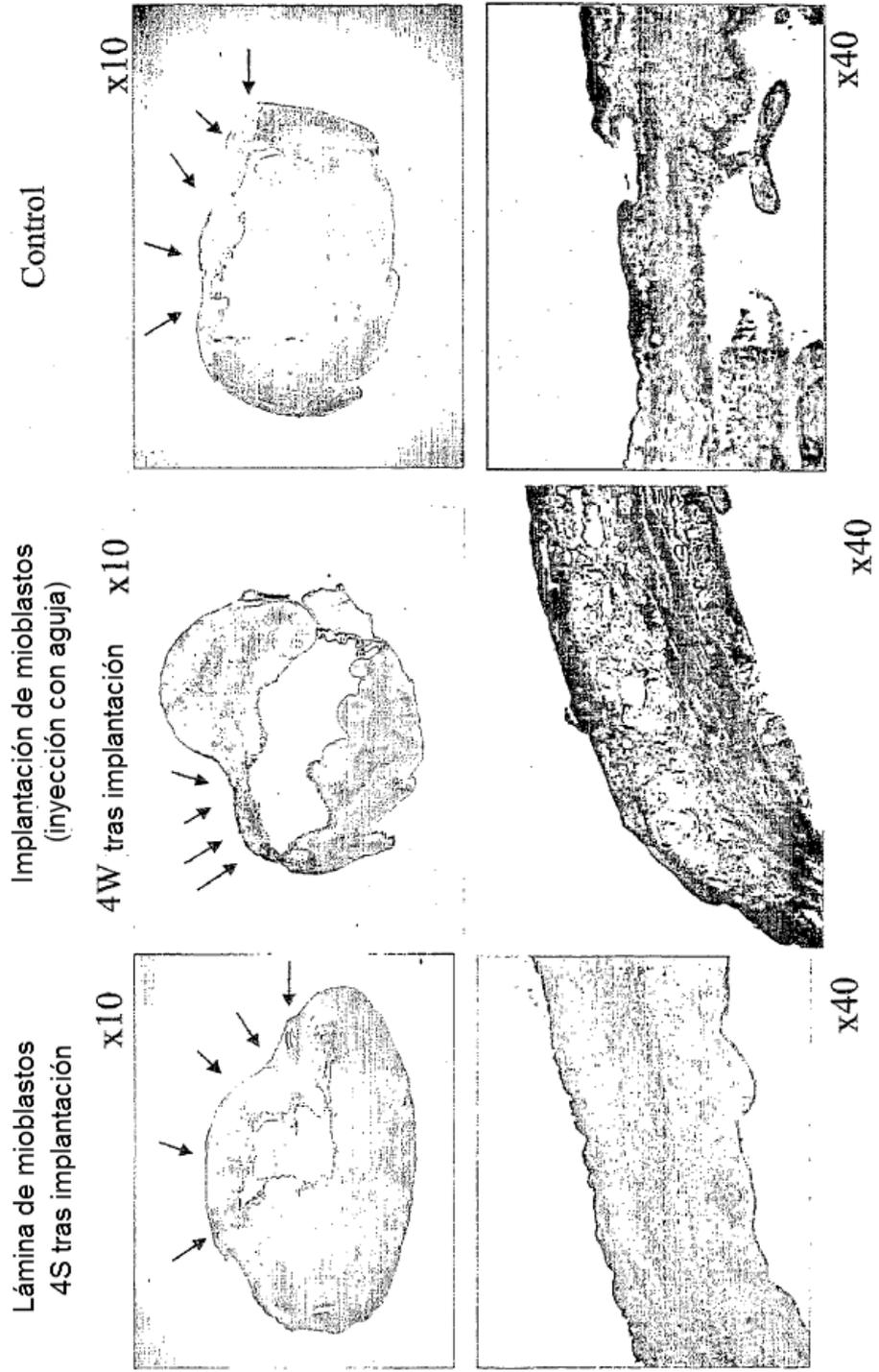
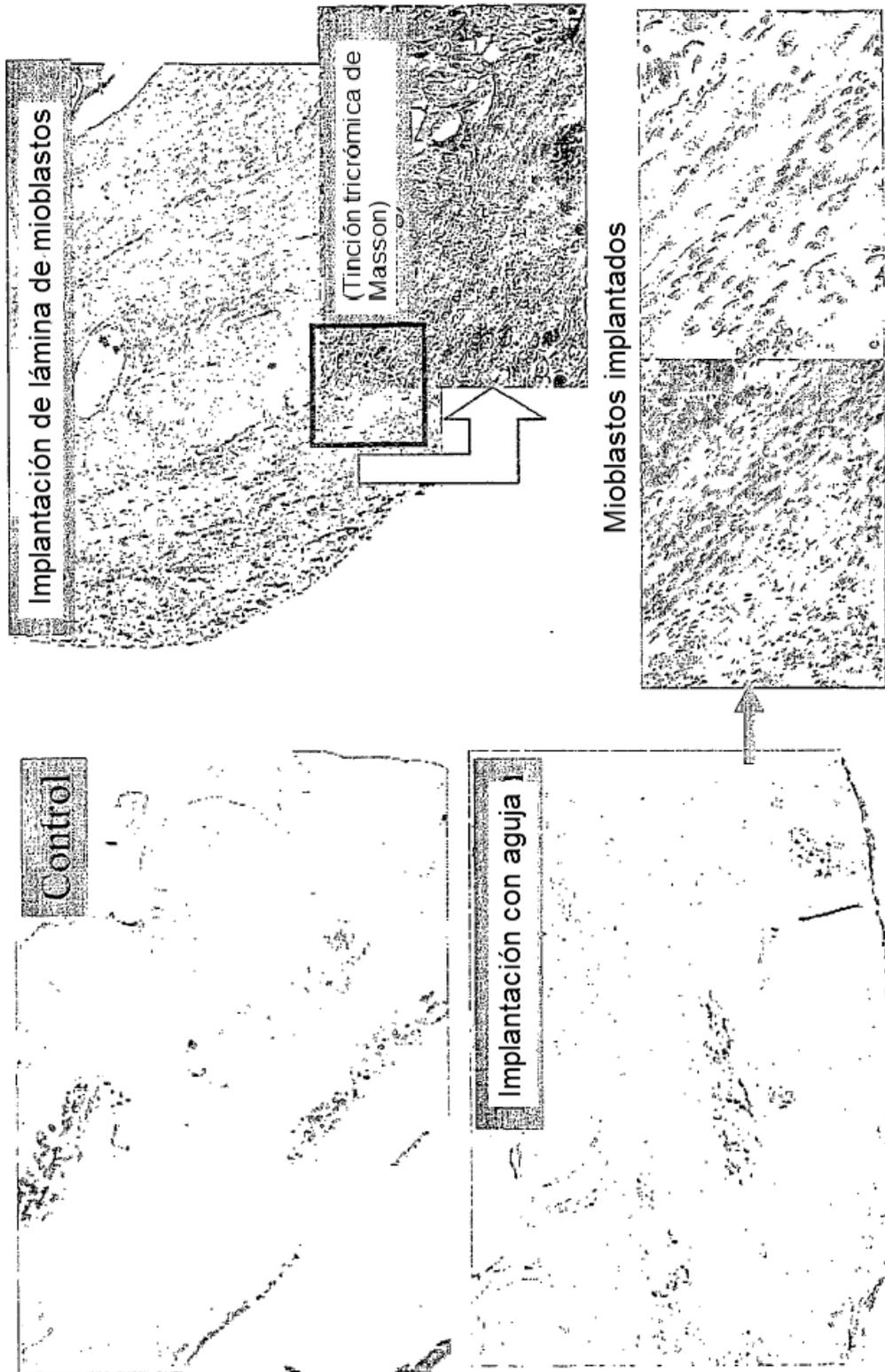


FIG.30B



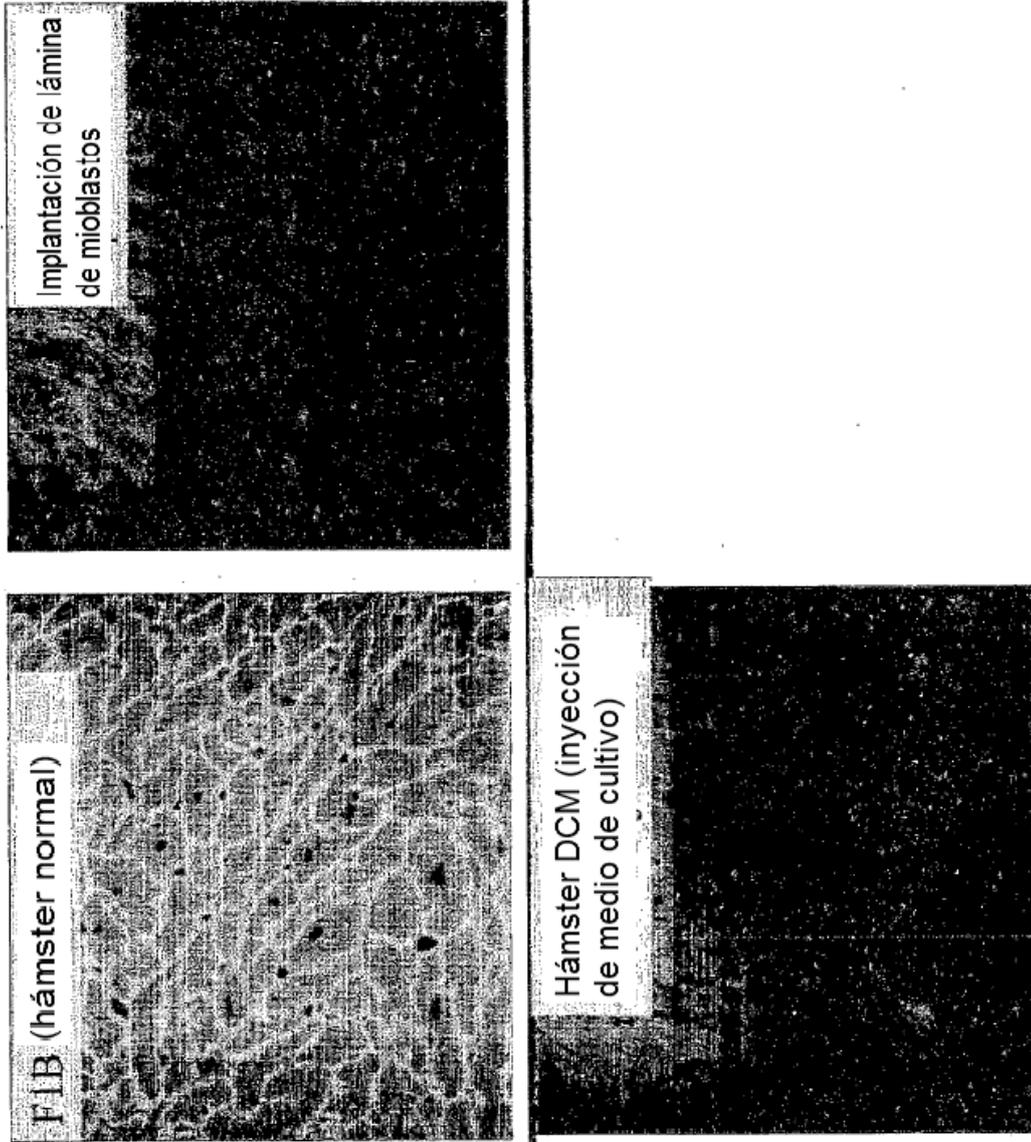


FIG.30C

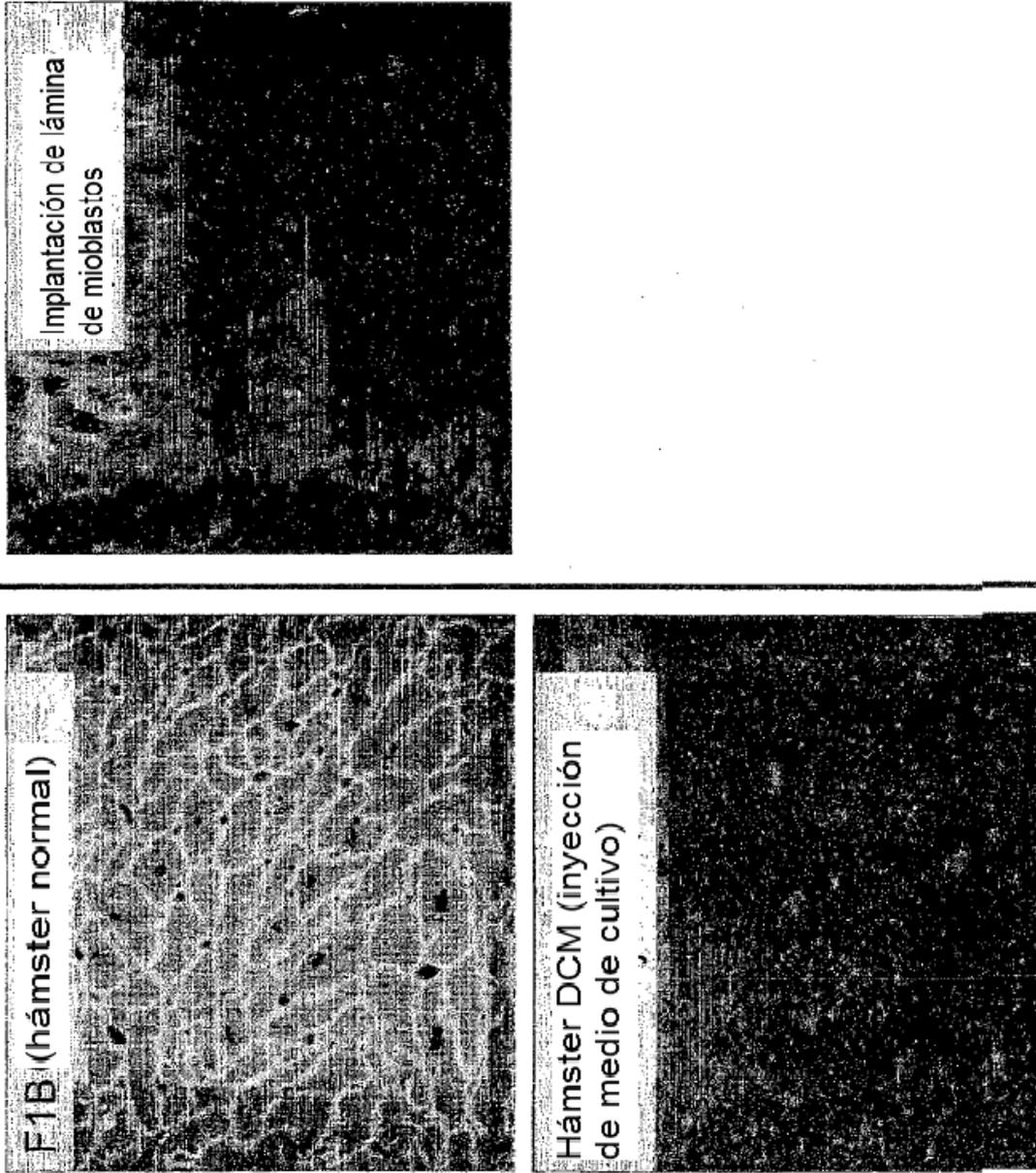
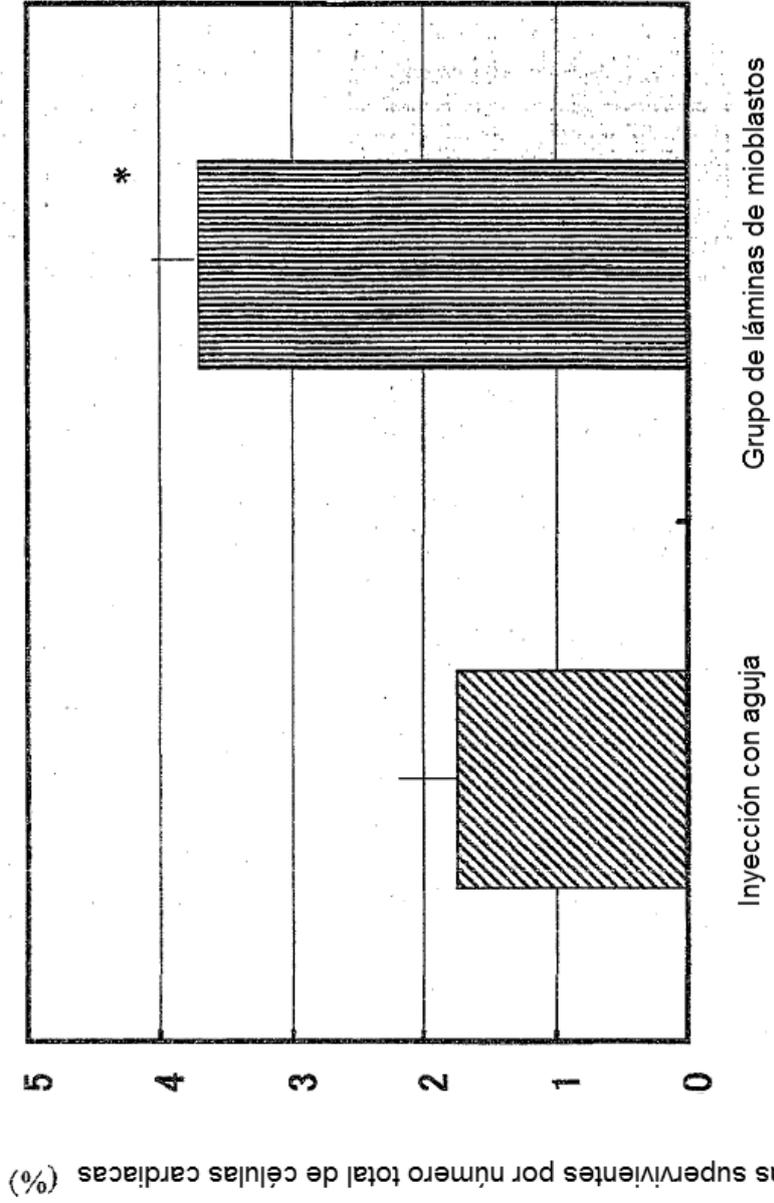


FIG.30D

**FIG.31** Tasa de supervivencia de las células implantadas



Número de células supervivientes por número total de células cardíacas (%)

# FIG.32 Propiedades electrónicas de la lámina de mioblastos

Sistema MED

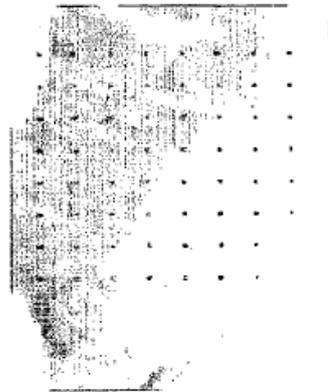


Lámina de cardiomiocitos

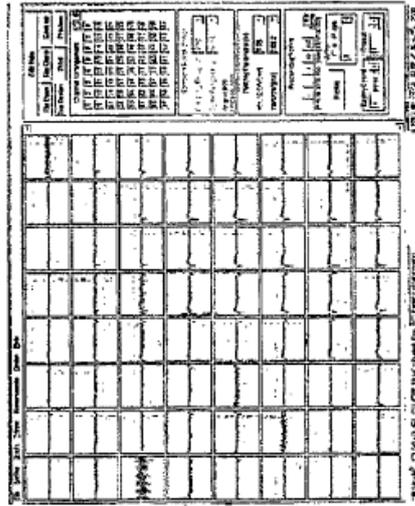
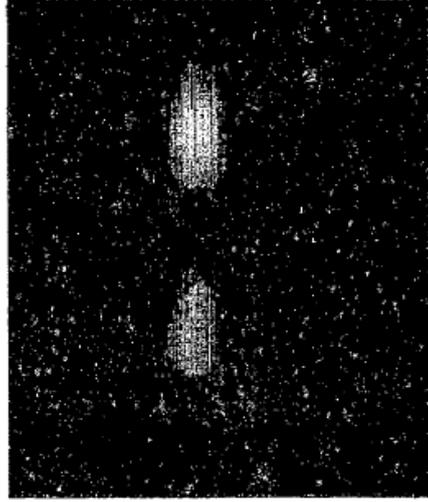
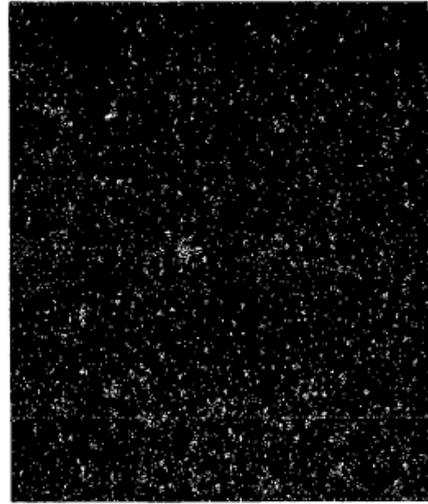
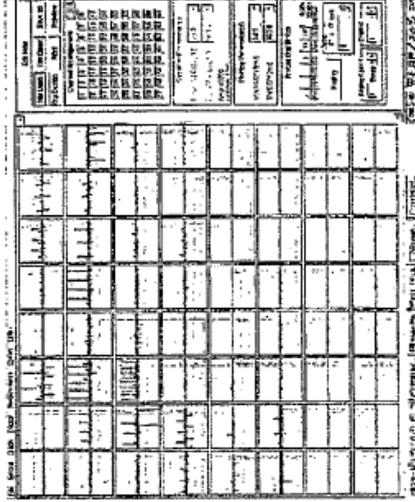
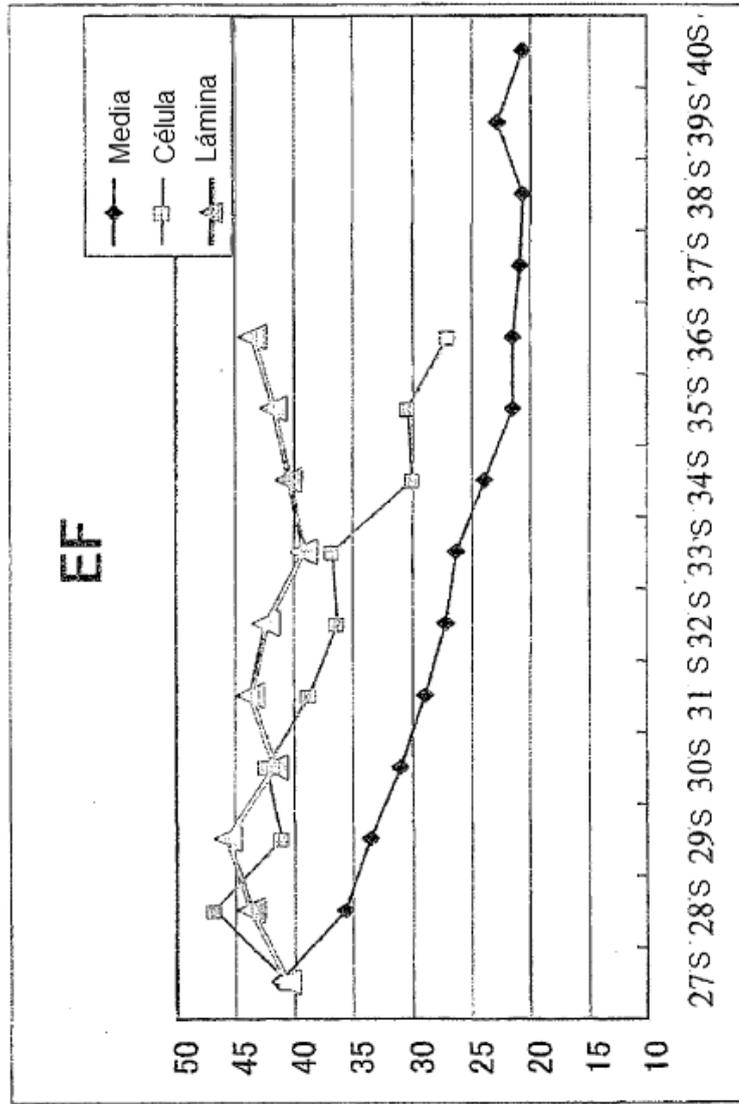


Lámina de mioblastos



**FIG.33A** Implantación de lámina de mioblastos a hámster  
con miocardiopatía dilatada



Tinción HE

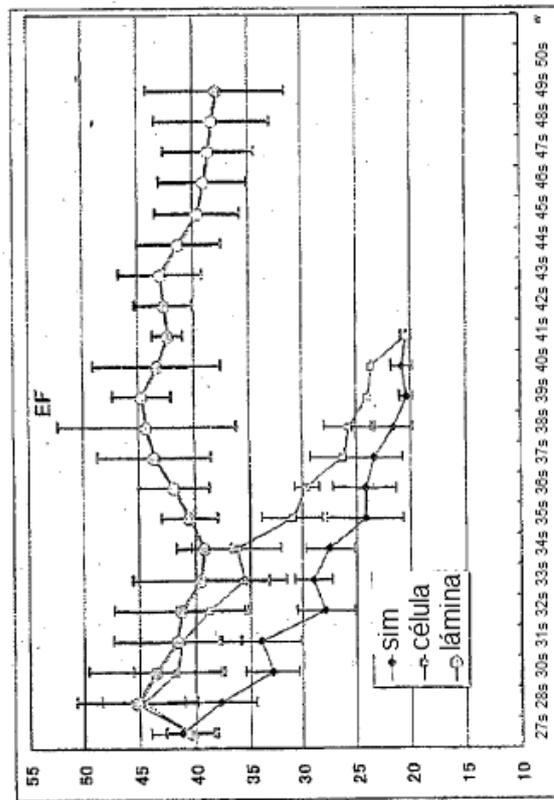


Tinción tricrómica de Masson



**FIG.33B**

Diámetro telesiástico del  
ventrículo izquierdo



Diámetro telediastólico del  
ventrículo izquierdo

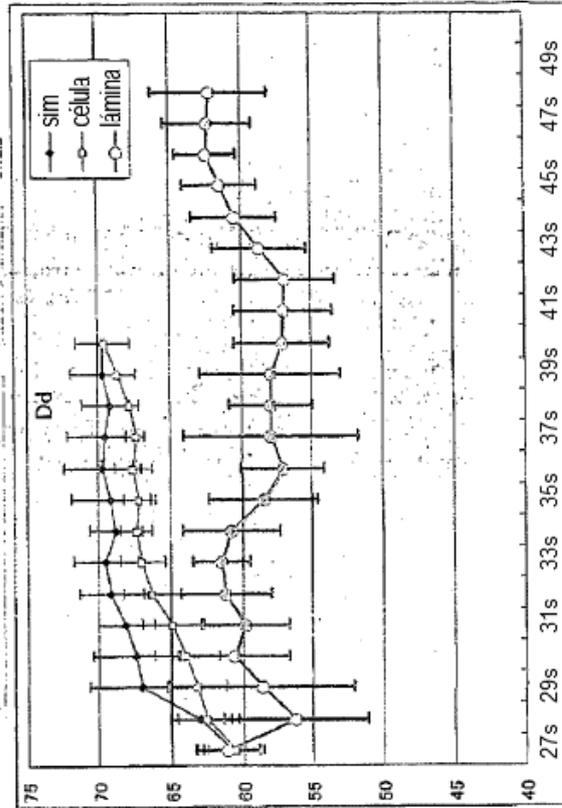


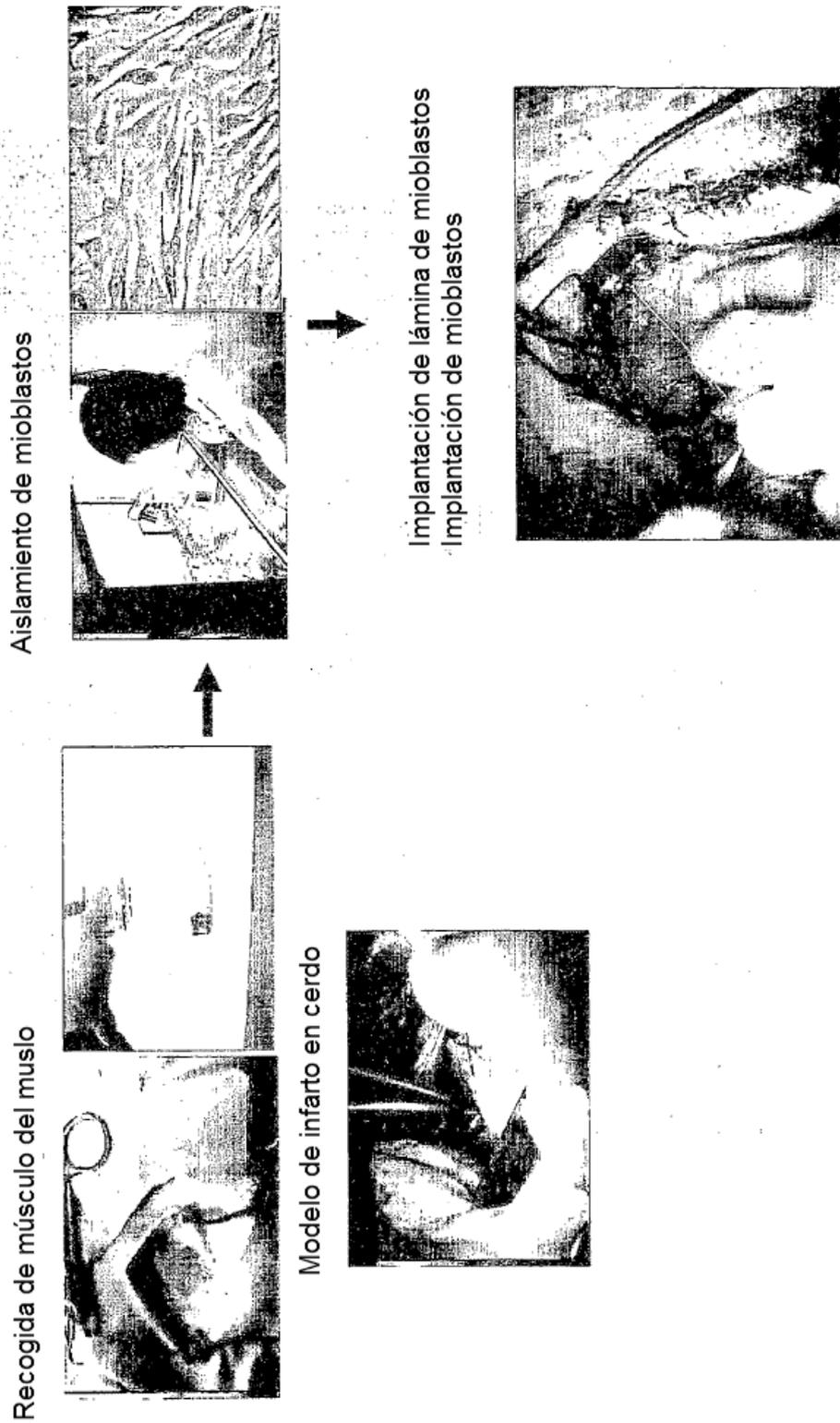
FIG.33C

Grupo control

Grupo de implantación de lámina de mioblastos

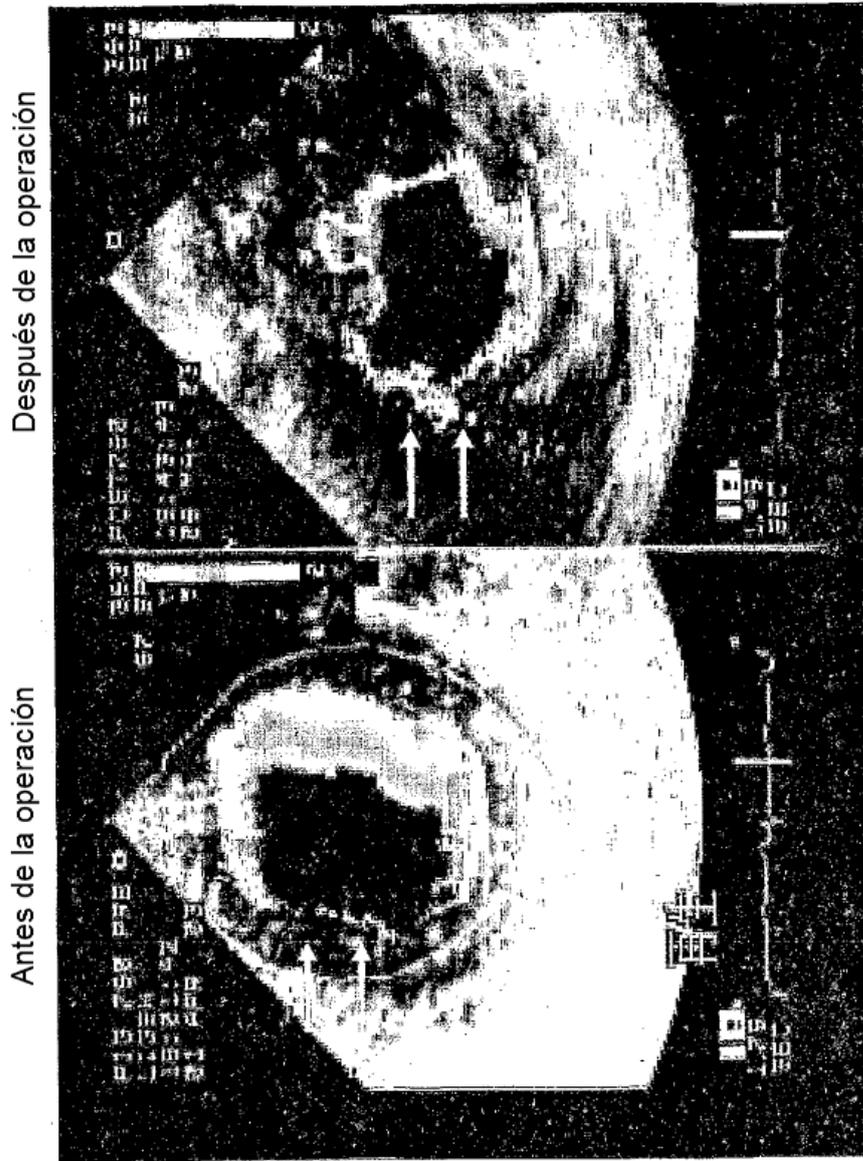


**FIG.34** Implantación de lámina de mioblastos en modelo de infarto en cerdo



Evaluación de la función cardíaca (función sistólica) del modelo de infarto en cerdo mediante el método de CKI

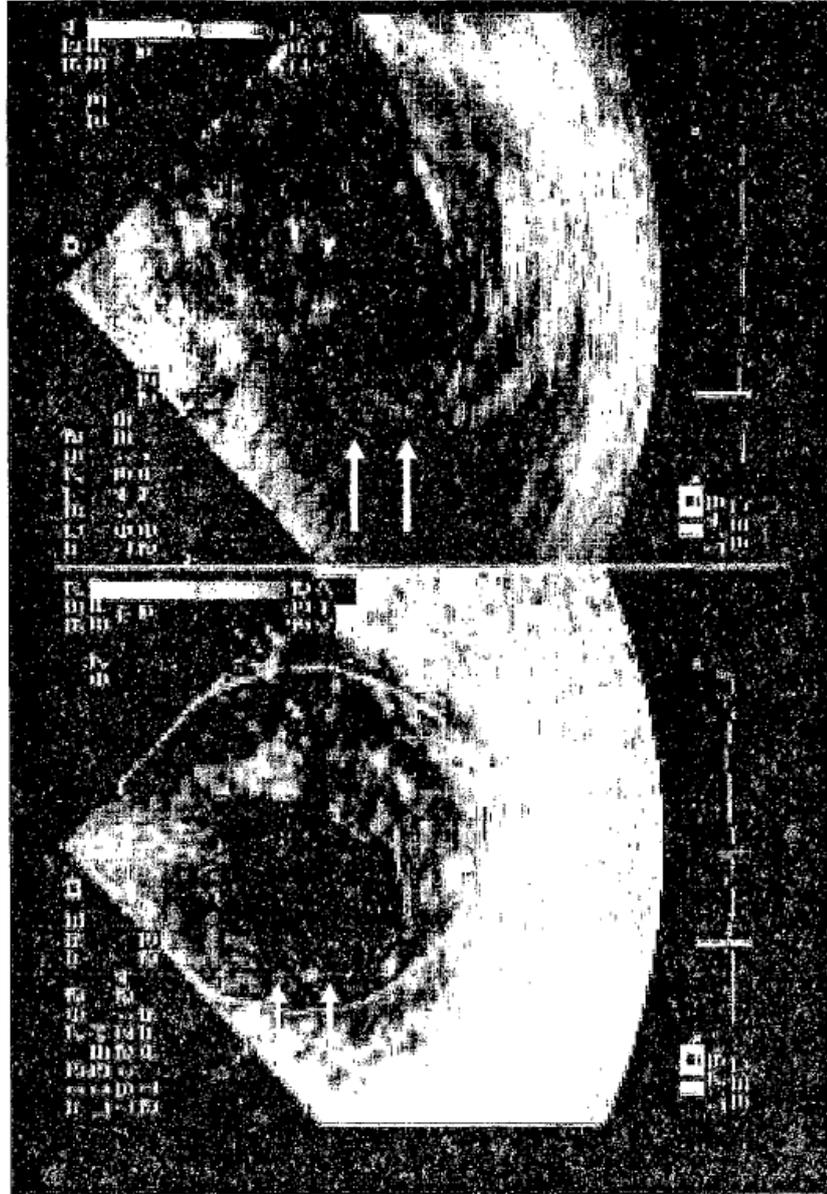
**FIG.35**



**FIG.36** Evaluación de la función cardíaca (función diastólica) del modelo de infarto en cerdo mediante el método CKI

Antes de la operación

Después de la operación



↑  
Lugar de implantación

FIG.37

Sin ácido ascórbico

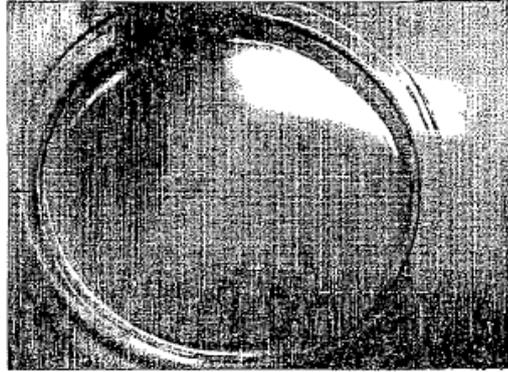


FIG.38

Con ácido ascórbico

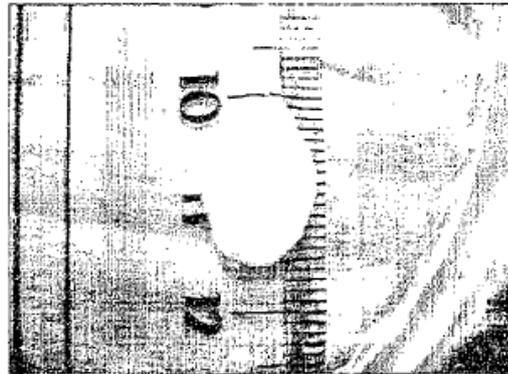


FIG.39



FIG.40

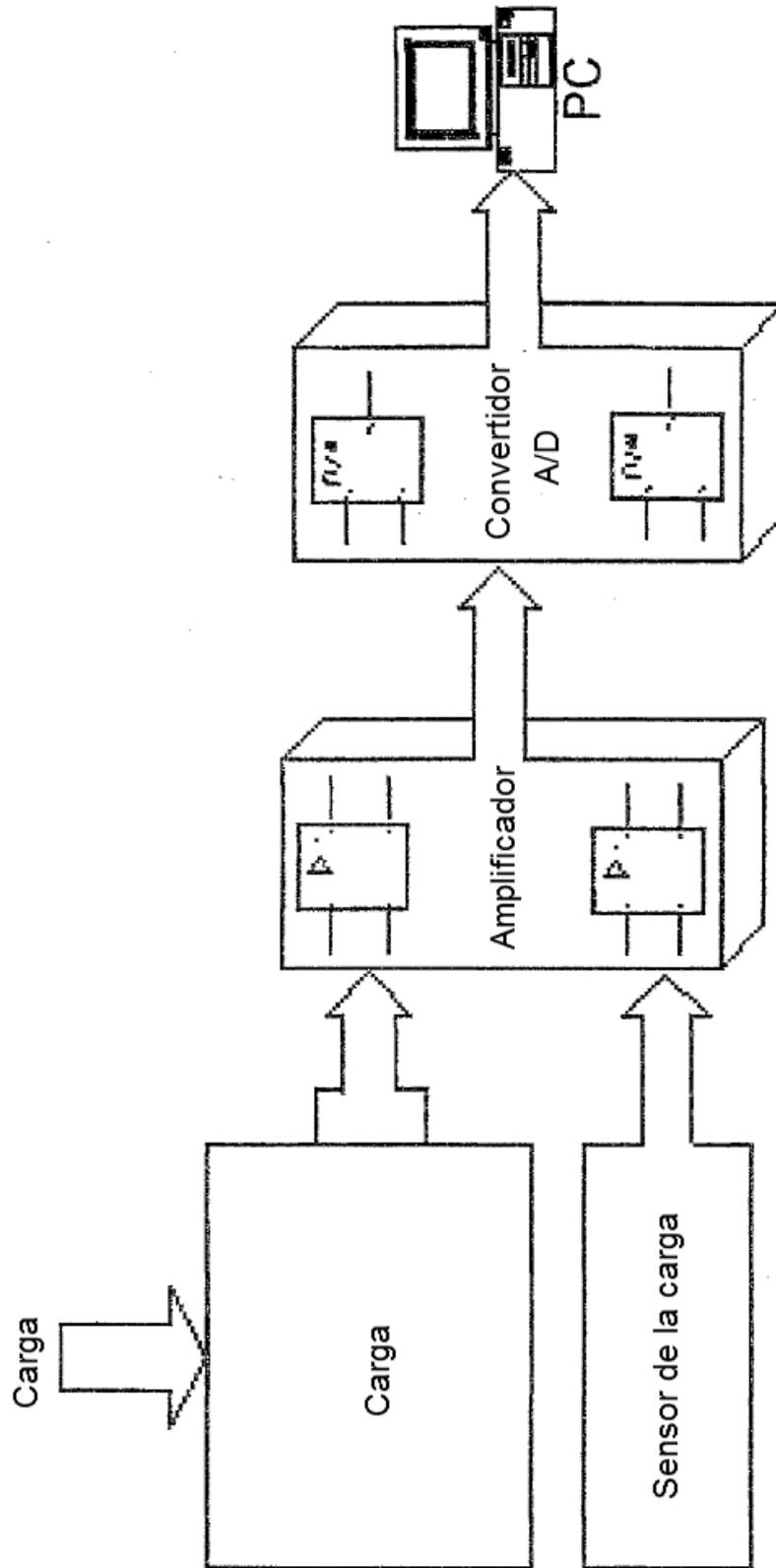
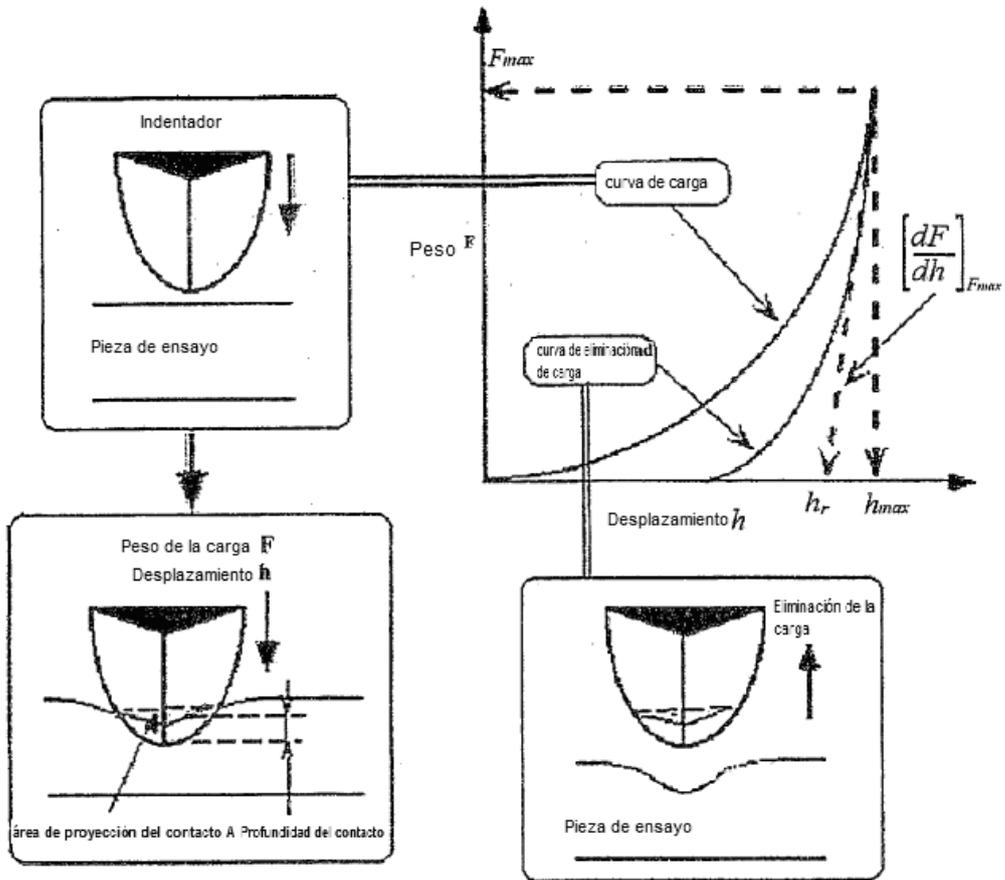


FIG.41



Rigidez  $H = \frac{F}{A} = \frac{F}{k_1 h_p^2}$

Módulo de Young  $E = \left[ \frac{dF}{dh} \right]_{F_{max}} \frac{1 - \nu^2}{2 \cdot k_2 \cdot h_{pmax}}$

profundidad de contacto  $h_p = h_r + 0,25(h_{max} - h_r)$

- $F$  : Carga
- $A$  : área de proyección del contacto
- $h_p$  : profundidad de contacto
- $k_1, k_2$  : Coeficiente de la forma
- $F_{max}$  : Carga máxima
- $h_{max}$  : Desplazamiento max.
- $h_r$  : Punto en el cual la línea tangencial cruza el peso 0
- $dF/dh$  : Gradiente de la línea tangencial de la curva de eliminación de la carga
- $\nu$  : proporción de Poisson

FIG.42

