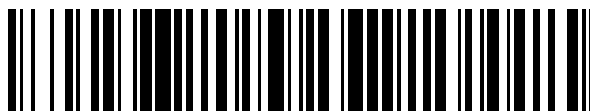


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 428**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0735 (2010.01)
C12N 5/077 (2010.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 35/34 (2006.01)
A61K 35/54 (2015.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2004 E 04737076 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 1641912**

54 Título: **Modelado de tejidos en un sistema de células madre embrionarias (ES)**

30 Prioridad:

20.06.2003 US 480212 P
20.06.2003 EP 03013980

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.09.2016

73 Titular/es:

AXIOGENESIS AG (100.0%)
NATTERMANNALLEE 1, GEBÄUDE S20
50829 KÖLN, DE

72 Inventor/es:

KOLOSSOV, EUGEN;
HESCHELER, JÜRGEN;
BOHLEN, HERIBERT;
FLEISCHMANN, BERND;
RÖLL, WILHELM;
EHLICH, ANDREAS y
KÖNIGSMANN, JESSICA

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 584 428 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

Modelado de tejidos en un sistema de células madre embrionarias (ES)

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere en general al uso de tipos de células embrionarias y derivados de células madre embrionarias para su uso en la regeneración de tejidos y aplicaciones no terapéuticas como la selección de fármacos.

10

[0002] La presente invención no se refiere al uso de células derivadas de un embrión humano.

Antecedentes de la técnica

15 **[0003]** Las células precursoras se han convertido en un interés central para la investigación médica. Muchos tejidos del organismo tienen un reservorio de seguridad de precursores que pueden sustituir a células senescentes o dañadas por "lesión o enfermedad". Recientemente se ha hecho un esfuerzo considerable para aislar precursores de varios tejidos diferentes para su uso en medicina regenerativa. Las fuentes y sistemas para la producción de células diferenciadas a partir de una población de células madre para su uso donde quiera que se desee una población celular relativamente homogénea se han resumido, por ejemplo, en la solicitud de patente de EE. UU. US2003/0040111. Puede inducirse a células madre embrionarias (ES) multi y pluripotentes así como a células germinales embrionarias (EG) de mamífero a diferenciarse en cultivo en diversos tipos de células, incluso células de músculo cardíaco. No obstante, los cardiomiocitos derivados de células ES constituyen solo del 1 al 5% de todas las células en los cuerpos embrioides (EB) diferenciados. La fracción principal de estos está compuesta de células ES 25 indiferenciadas portadoras de un potencial tumorigénico significativo.

[0004] Recientemente se ha descrito la selección genética de tipos de células específicos a partir de cultivos en diferenciación de células madre embrionarias (ES) basada en el uso de elementos reguladores génicos específicos de tejido, promotores que dirigen casetes de resistencia a fármacos, véase, por ejemplo, la solicitud internacional WO02/051987. Por tanto, los determinados tipos celulares diferenciados originados a partir de clones transgénicos de ES que poseen el vector correspondiente, podrían seleccionarse mediante la aplicación del correspondiente fármaco que elimina a todos los demás tipos celulares emergentes así como a células ES indiferenciadas. Hasta la fecha esta técnica ha resultado más específica y eficaz para un alto grado de purificación de células cardíacas, neuronales y secretoras de insulina a partir de cultivos de células ES en diferenciación.

35

[0005] No obstante, un reto importante para el uso de células madre en terapia es controlar el crecimiento y la diferenciación en el tipo de tejido en particular requerido para el tratamiento de cada paciente. Por tanto, existe la necesidad de nuevas técnicas para generar poblaciones de células y tejidos diferenciados adecuados para su administración a humanos. La solución a dicho problema técnico se logra proporcionando las realizaciones 40 caracterizadas en las reivindicaciones y descritas con más detalle a continuación.

Resumen de la invención

La presente invención no se refiere al uso de células derivadas de un embrión humano.

45

[0006] Es sabido que cada tejido consta de un tipo principal de células específico que determina su papel funcional junto con tipos celulares auxiliares (p. ej., fibroblastos, células del estroma, endoteliales, gliales, etc.), que son importantes para mantener la estructura arquitectónica tridimensional de un tejido, su función trófica y las interconexiones con otros sistemas tisulares del organismo completo.

50

[0007] La presente invención se basa en la teoría de que el diseño de la mayoría de los tejidos que constituyen un organismo adulto se establece en el desarrollo embrionario inicial cuando aparecen los tipos celulares correspondientes durante la diferenciación formando interconexiones según moléculas de señalización y receptores emergentes específicos. Por tanto, puede esperarse que cuando diferentes tipos celulares que contribuyen a un determinado tipo de tejido se seleccionan genéticamente a partir del mismo cultivo de células ES en diferenciación, estos formarán interconexiones y estructuras arquitectónicas según sus indicaciones naturales específicas determinadas genéticamente. En ese caso, el alto nivel de purificación de las células de interés en un cultivo en diferenciación de células ES genéticamente modificadas es la premisa principal para el "autoensamblaje" de una estructura similar al tejido en el transcurso de la diferenciación de células ES *in vitro*.

55

[0008] Según la presente invención se podría mostrar sorprendentemente que el cocultivo y el cotrasplante de cardiomiocitos derivados de células ES con fibroblastos embrionarios lleva a la formación de tejido similar al cardíaco *in vitro* y a una mejora significativa en los resultados del trasplante cuando se inyectan en corazones 5 crioinfartados de ratones.

[0009] Por tanto, en un aspecto la presente invención se refiere a un procedimiento de modelado y/u obtención de tejido cardíaco o estructuras similares a tejido que comprende cultivar un primer tipo de células derivadas de células madre (ES) embrionarias en presencia de al menos un segundo tipo de células embrionarias; y 10 a permitir la integración y alineamiento de dichos al menos dos tipos de células en el tejido cardíaco o estructuras similares a tejido, donde preferiblemente la célula ES de dicho primer tipo de células derivadas de células ES comprende un marcador seleccionable unido de forma operativa a una primera secuencia reguladora específica de tipo de células específicas para dicho primer tipo de células. De este modo la aplicación de un sistema de alta eficiencia de selección de fármacos aumenta de forma eficaz (de 5 a 10 veces) el rendimiento final debido a la 15 proliferación intensiva de cardiomiocitos y reduce la amenaza de desarrollo tumoral tras el trasplante a un nivel insignificante.

[0010] Con respecto a lo anterior, la presente invención generalmente se refiere a un procedimiento para mejorar la reparación del tejido cardíaco y/o la función del órgano en un mamífero que comprende las etapas de: 20

(a) introducir un inóculo celular que comprende un cocultivo de tipos celulares derivados de células ES en el que se ha iniciado la diferenciación con células auxiliares embrionarias o introducir un tejido diferenciado al menos en una porción del área previamente dañada del tejido, y

(b) permitir que dicho inóculo celular introducido se implante *in situ* como células o tejido viables situados dentro del área previamente dañada del tejido, donde el implante tiene como resultado una mejora del tejido y/o de la función del órgano en dicho mamífero, siempre que las células no deriven de un embrión humano.

[0011] Las células auxiliares son preferiblemente fibroblastos y/o células endoteliales. 30

[0012] En particular, se proporciona un procedimiento para mejorar la función cardíaca en un mamífero tras un infarto de miocardio, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de

(a) cultivar células madre embrionarias (ES) de mamíferos indiferenciadas que comprenden un gen resistente y un 35 gen indicador bajo el control del mismo promotor específico cardíaco *in vitro* en un medio de cultivo que contiene el agente selectivo para el gen de resistencia en condiciones que permiten la diferenciación de dichas células ES en cardiomiocitos;

(b) aislar dichos cardiomiocitos diferenciados y/o eliminar las células no diferenciadas, opcionalmente junto con 40 células que se diferencian en tipos células irrelevantes a partir de dichos cardiomiocitos en el transcurso de la diferenciación;

(c) cotrasplantar posteriormente dichos cardiomiocitos con fibroblastos embrionarios o derivados de células ES y/o células endoteliales a al menos una porción de la zona previamente infartada del tejido cardíaco; y 45

(d) permitir que dicho inóculo celular introducido se implante *in situ* como células viables situadas dentro del área previamente infartada del tejido cardíaco, donde el implante tiene como resultado una mejora de la función cardíaca en dicho mamífero siempre que las células no deriven de un embrión humano.

[0013] Para el trasplante real, se entenderá que el cotrasplante de las células puede no realizarse de forma 50 concomitante sino también de forma posterior de cualquier manera.

[0014] Puede que no siempre haya células embrionarias disponibles como fuente auxiliar del tipo de células derivado de células ES para su desarrollo en un determinado tejido o que determinadas células embrionarias no 55 sean adecuadas para este objetivo. Adicionalmente, pueden existir otros motivos por los que el uso de esas células no sea apropiado, por ejemplo, debido al diferente estado de desarrollo de las células.

[0015] Para superar estos posibles obstáculos se ha contemplado según la invención proporcionar asimismo los tipos celulares adicionales a partir de células ES. Por tanto, se ha desarrollado un sistema de modelado de

tejidos derivados de células ES. El núcleo central de la técnica propuesta es una selección por fármacos paralela de tipos de células que constituyen tejidos de interés en un cultivo de células ES en diferenciación. Una de las ventajas de dicha técnica es que las interacciones entre los tipos de células purificadas se procesan de forma "natural" inmediatamente después de liberarse de células irrelevantes, usando señales naturales para la señalización de "interferencias" y la formación de estructuras similares a tejido viables como resultado. Según la presente invención, en principio, pueden usarse dos variantes de dicha técnica:

a) se transfectan de forma estable clones múltiples de ES transgénicas con un determinado número de vectores con un casete de selección por fármaco dirigidos por promotores específicos según los tipos celulares que constituyen el tipo de tejido deseado. En esta variante todos los tipos celulares emergentes se originan a partir de un clon antecesor común de células ES y la proporción resultante entre los diferentes componentes celulares depende de la velocidad de diferenciación relativa de cada uno de ellos; véanse las figuras 2A y 3B.

b) se utilizan cuerpos embrioides (EB) quiméricos generándose varios clones de ES transgénicos mediante esta técnica, donde cada clon individual posee solo un vector con un casete de resistencia a fármacos dirigido por uno de los promotores específicos de tipo de células. Para el modelado del tejido, los clones relevantes se mezclan en la fase inicial de diferenciación ("gotas colgantes" o "cultivo en masa") para formar agregados de células ES (EB) donde, tras la selección por fármacos, surgen tipos celulares que tienen su origen en los correspondientes clones celulares de ES diferentes, y la proporción final de los componentes celulares también depende y puede controlarse mediante la proporción inicial entre diferentes líneas células de ES; véanse las figuras 2B y 3C.

[0016] Por tanto, en un aspecto adicional la presente invención se refiere a un procedimiento de modelado y/u obtención de tejido cardíaco o estructuras similares a tejido que comprende las etapas de:

(a) transfectar una o más células ES con moléculas de ácido nucleico recombinantes que comprenden una primera y una segunda secuencia reguladoras específicas de tipo celular unidas de forma operativa a al menos un marcador seleccionable, en el que dicho segundo tipo celular es diferente de dicho primer tipo celular;

(b) cultivar las células en condiciones que permitan la diferenciación de las células; y

(c) aislar células de al menos dos tipos celulares diferenciados y/o eliminar las células no diferenciadas, opcionalmente junto con células en diferenciación hacia tipos celulares irrelevantes a partir de los tipos de células de interés que activen el marcador seleccionable en el transcurso de la diferenciación siempre que las células no deriven de un embrión humano.

[0017] De igual modo, la presente invención se refiere a células que se obtienen por los procedimientos de la invención, donde dichas células son capaces de diferenciarse en al menos dos tipos celulares. De igual modo, se abarcan un agregado celular de al menos dos tipos celulares diferentes que se obtienen por el procedimiento de la invención y el tejido que comprende células o un agregado celular obtenidos por el procedimiento de la invención, así como órganos, implantes y trasplantes que comprenden esas células, agregados celulares o tejido.

[0018] La posibilidad de utilizar células ES humanas en la terapia de sustitución de tejido hace que el problema de la purificación a alto nivel de los tipos de células diferenciadas derivadas de células ES sea una de las piedras angulares del futuro de la trasplantología basada en células ES. Aún no se han establecido los altos patrones y criterios de pureza para los tipos celulares específicos derivados de células ES seleccionados para fines terapéuticos. Hasta la fecha, en un modelo murino, se ha demostrado que la técnica basada en la selección por fármacos de tipos celulares diferenciados derivados de células ES genéticamente modificadas es la más eficaz en términos de ausencia de células ES indiferenciadas en la producción final así como una baja tasa de incidencia de carcinomas embrionarios en los animales receptores. Además del problema de la pureza, la calidad del implante de las células trasplantadas en el tejido receptor, especialmente en uno deteriorado, podría depender en gran medida de células auxiliares (fibroblastos conectores, células del estroma, endoteliales, gliales, etc.). Todos estos elementos tisulares importantes sufren en el tejido dañado del receptor, a igual que el tipo principal de células, y por esto se generan problemas adicionales para el proceso de implante de las células trasplantadas, especialmente en sus etapas más tempranas. Por tanto, la formación de tejido durante la diferenciación de células ES humanas podría convertirse en un procedimiento importante para la obtención de un prototipo de tejido viable con altas posibilidades para el trasplante.

[0019] En un aspecto en particular, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica que mejore la función cardíaca en un mamífero tras un infarto de miocardio,

comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- (a) transfectar células madre embrionarias (ES) de mamífero con una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un gen de resistencia bajo el control de secuencias reguladoras específicas cardíacas, de fibroblastos y, opcionalmente, de endotelio y que, opcionalmente, comprenden uno o más indicadores en las mismas secuencias reguladoras;
- (b) cultivar dichas células ES *in vitro* en un medio de cultivo que contiene el agente selectivo para el gen de resistencia en condiciones que permitan la diferenciación de dichas células ES en cardiomiocitos, fibroblastos y, opcionalmente, células endoteliales;
- (c) eliminar a partir de dichos cardiomiocitos, fibroblastos y, opcionalmente, células endoteliales diferenciadas células no diferenciadas, opcionalmente junto con células en diferenciación hacia tipos celulares irrelevantes; opcionalmente
- (d) permitir el alineamiento de dichos cardiomiocitos, fibroblastos y, opcionalmente, células endoteliales en diferenciación en el tejido similar a cardíaco;
- (e) cotrasplantar posteriormente dichos cardiomiocitos, fibroblastos y, opcionalmente, células endoteliales o dicho tejido en al menos una porción de la zona previamente infartada del tejido cardíaco; y
- (f) permitir que dichas células o tejido introducido se implante *in situ* como células viables situadas dentro del área previamente infartada del tejido cardíaco, donde el implante tiene como resultado una mejora de la función cardíaca en dicho mamífero siempre que las células no deriven de un embrión humano.
- [0020]** Los vectores y composiciones de vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico recombinantes según se usan en los procedimientos de la presente invención también son objeto de la presente invención, como también lo son las células que comprenden dicho vector o composiciones de vector.
- [0021]** El modelado *in vitro* de diferentes tipos de tejido a partir de, por ejemplo, células ES murinas tiene diferentes aplicaciones en (i) estudios *in vitro* en las etapas iniciales de formación de tejidos durante el desarrollo embrionario así como en la influencia de diferentes tipos de factores y compuestos químicos sobre este proceso. Esto último hace a la técnica propuesta útil para (ii) un ensayo *in vitro* de toxicología embrionaria de alto rendimiento, donde pueden probarse diversas sustancias no solo por su capacidad para influir sobre la diferenciación específica del tipo celular sino también sobre el íntimo proceso de "autoensamblaje" de las células diferenciadas en un tipo de tejido especializado. La formación de estas estructuras similares a tejido *in vitro* supone también una mejora de la funcionalidad y viabilidad en comparación con homólogos individualizados. Por tanto, los procedimientos de la presente invención proporcionan una buena base para (iii) ensayos farmacológicos y farmacocinéticos *in vitro* de alto rendimiento, donde podrían probarse los efectos funcionales directos y los efectos secundarios a nivel tisular de diferentes compuestos con efectos dirigidos a tejido esperados. En todas las implicaciones mencionadas anteriormente se asume una disminución significativa del uso caro y éticamente controvertido de animales tanto para fines científicos como de selección. Todos los aspectos mencionados anteriormente para células ES murinas ((i), (ii) y (iii)) son completamente aplicables a la formación de tejidos a partir de células ES humanas con un acento notable en que estos son prácticamente la única elección posible para proporcionar estudios embriológicos y de selección de alto rendimiento en un modelo humano.
- [0022]** Para dichas realizaciones es especialmente adecuado el uso de chips o matrices que contienen las células en diferenciación de la presente invención. Por tanto, la presente invención también se refiere a matrices que comprenden un soporte sólido y células unidas al mismo o suspendidas en él, también se refiere a un agregado celular o tejido preparado según la presente invención, en especial, a matrices de microelectrodos (MEA). En este contexto, la presente invención también abarca a dispositivos adaptados para el análisis de dichas matrices.
- [0023]** Por tanto, la presente invención también se refiere a procedimientos para obtener y/o realizar el perfil de una sustancia de ensayo capaz de influir sobre el desarrollo de células cardíacas y/o sobre la formación de la estructura tisular que comprende las etapas de:
- (a) poner en contacto una muestra de ensayo que comprende células, un agregado celular, tejido o un órgano preparada según la presente invención con una sustancia de ensayo; y
- (b) determinar una respuesta fenotípica en dicha muestra de ensayo en comparación con una muestra control, en la

que un cambio en la respuesta fenotípica de dicha muestra de ensayo en comparación con la muestra control es una indicación de que dicha sustancia de ensayo tiene un efecto sobre el desarrollo celular y/o la formación de la estructura tisular.

- 5 **[0024]** Esos procedimientos, que preferiblemente se realizan sobre un chip o una matriz, se implementan de forma ventajosa en cualquiera de los procedimientos para obtención/modelado de tejidos descrito en este documento, donde dicha muestra de ensayo se pone en contacto con dicha sustancia de ensayo antes, durante o después de que dicha célula o agregado celular pase a través de dicho procedimiento. Estos procedimientos de selección pueden combinarse con otros procedimientos de fabricación de fármacos o servir para refinarlos, en particular de fármacos que ayudan a la curación de herida y/o a la curación de tejidos dañados. Esos procedimientos pueden comprender por ejemplo, la mezcla de la sustancia aislada con un vehículo farmacéuticamente aceptable y el acondicionamiento en un recipiente apropiado con las correspondientes indicaciones para el tratamiento terapéutico previsto.
- 10
- 15 **[0025]** Para todos los procedimientos de la presente invención se proporcionan kits útiles para realizar dichos procedimientos que contienen los vectores o composiciones de vectores mencionados, matrices, células pluripotentes y, opcionalmente, un medio de cultivo, moléculas de ácido nucleico recombinantes, compuestos patrón, etc., siempre que las células no deriven de un embrión humano.
- 20 **[0026]** Otras realizaciones de la invención serán aparentes a partir de la descripción que se recoge a continuación.

Breve descripción de los dibujos

- 25 **[0027]**
- Fig. 1:** Esquema principal de los vectores para el modelado de tejidos en el sistema de células ES de la presente invención
- 30 **Fig. 2:** Dos vectores: (A) Un clon de células ES transgénicas; (B) Dos clones de células ES transgénicas.
- Fig. 3:** Tres vectores: (A) Construcciones de vector; (B) Un clon de células ES transgénicas; (C) Tres clones de células ES transgénicas.
- 35 **Fig. 4:** Los cardiomiocitos derivados de células ES, EGFP⁺ seleccionados con puromicina se cocultivarón en placas con fibroblastos embrionarios de ratón. A, B - 1, 5d; C y D - 6d en cocultivo. Son evidentes los lineamientos de los cardiomiocitos EGFP⁺ con los fibroblastos los días 5^o y 6^o, respectivamente.
- Fig. 5:** Los fibroblastos embrionarios de ratón y los cardiomiocitos derivados de células ES, positivos para EGFP y purificados con puromicina se disociaron mediante tratamiento con colagenasa y se cocultivarón en placas sobre la MEA. El día 4 después de la disposición en placas el grupo de células cardíacos con latido espontáneo EGFP positivas para aplastado estaba completamente integrado en la capa de fibroblastos (A) y se registraba un PA regular a partir de la mayoría de ellos (B).
- 45 **Figura 6:** Los cardiomiocitos derivados de células ES seleccionados con puromicina se implantaban con éxito en las zonas crioinfartadas cuando se cotrasplantaban con fibroblastos sinérgicos. A, un corazón 40 días después del trasplante con luz de transmisión-fluorescente combinada; B, C, los cardiomiocitos derivados de células EC (C) positivas para EGFP implantadas muestran estriado tras una inmunotinción con a-actinina (B).

50 Descripción de la invención

- [0028]** Células madre de diversos tipos se ha convertido en una modalidad extremadamente atractiva en la medicina regenerativa. Estas pueden proliferar en cultivo y, a continuación, diferenciarse *in vitro* o *in situ* en los tipos celulares necesarios para el tratamiento. Sin pretender estar ligado a la teoría, es una hipótesis de esta invención que algunas de las poblaciones de células diferencias producidas usando procedimientos de cultivo adaptativo y selección positiva no serán óptimas para su uso en terapia humana. En algunas circunstancias, las células indiferenciadas en la población pueden alterar la implantación o función de las células *in vivo*. Las células indiferenciadas también pueden aumentar la posibilidad de formación de una neoplasia maligna u otro tipo de tumor en el lugar del implante terapéutico, o mediante migración de las células trasplantadas. Además, o alternativamente,
- 55

la provisión e implantación de un tipo celular embrionario en particular puede a menudo no ser suficiente para conseguir la reconstitución de, por ejemplo, el tejido dañado.

[0029] Esta invención está dirigida a procedimientos para proporcionar protocolos y procedimientos para proporcionar tejidos y órganos de novo especialmente útiles para el trasplante y otros fines como se caracteriza en las reivindicaciones.

[0030] En un primer grupo de experimentos según la presente invención podría mostrarse que los cardiomiocitos purificados con puromicina muestran integración y alineamiento con fibroblastos embrionarios en cocultivo con estructuras de tipo tisular. No obstante, la cuestión sigue siendo si estas estructuras similares a tejido son comparables, o al menos están suficientemente próximas, al tejido cardíaco nativo y, si es así, si el efecto observado en cultivo *in vitro* también puede conseguirse *in vivo*.

[0031] Experimentos posteriores podrían demostrar que los cardiomiocitos derivados de células ES seleccionados mediante puromicina pueden implantarse en las zonas crioinfartadas del corazón de un ratón cuando se cotrasplantan con fibroblastos embrionarios singénicos. Esos cardiomiocitos derivados de células ES muestran la morfología de subtipos cardíacos diferentes que ofrecen un aparato contráctil bien desarrollado.

[0032] Por tanto, se ha establecido un sistema de alta eficacia de selección de fármaco y control de calidad de tipos celulares derivados de células ES transgénicos como los cardiomiocitos. La selección de fármacos aumenta de forma eficaz (de 5 a 10 veces) el rendimiento final debido a la proliferación intensiva específica de tipo celular y reduce la amenaza de desarrollo tumoral tras el trasplante a un nivel insignificante. Además, el cocultivo y el cotrasplante de tipos celulares derivados de células ES con tipos celulares embrionarios pertenecientes al tejido conjuntivo como los fibroblastos permite la generación de tejido nativo y estructuras similares a tejido *in vitro* e *in vivo*.

[0033] Las técnicas de esta invención se han diseñado en parte para proporcionar poblaciones celulares con características mejoradas para la terapia humana siempre que las células no deriven de un embrión humano. Tras la depleción de las células indiferenciadas, se espera que la población de tipos celulares embrionarios y derivadas de células ES diferenciadas diferentes posea mejores características funcionales y de implante, y tenga un riesgo reducido de generar arquitectura tisular no deseada y neoplasias malignas en el sujeto tratado. Además, las poblaciones celulares de diferentes tipos celulares embrionarios y derivados de células ES que se desarrollan en tejido están relacionadas más de cerca con la situación *in vivo*, lo que proporciona una ventaja notable para aplicaciones no terapéuticas como la selección de candidatos a fármacos.

Definiciones

[0034] Para los fines de esta descripción, el término "célula madre" puede referirse a células madre o a células germinales, por ejemplo madre embrionarias (ES) siempre que las células no deriven de un embrión humano y células germinales (EG), respectivamente. Brevemente, una célula madre tiene la capacidad de proliferar y formar células de más de un fenotipo diferente, y también es capaz de autorrenovarse, como parte del mismo cultivo, o cuando se cultiva en condiciones diferentes. Las células madre embrionarias también son típicamente positivas para telomerasa y positivas para OCT-4. La actividad telomerasa puede determinarse usando el ensayo de actividad TRAP (Kim y col., Science 266 (1997), 2011), usando un kit disponible en el mercado (Kit de Detección de Telomerasa TRAPeze(R) XK, N.º de cat. s7707; Intergen Co., Purchase N.Y. o TeloTAGGG(TM) Telomerase PCR ELISApus, N.º de cat. 2 013 89; Roche Diagnostics, Indianápolis). La expresión de hTERT puede también evaluarse a nivel de ARNm mediante RT-PCR. El kit de cuantificación de hTERT LightCycler TeloTAGGG(TM) (N.º de cat. 3 012 344; Roche Diagnostics) está disponible en el mercado con fines de investigación.

[0035] Las "células germinales embrionarias" o "células EG" son células derivadas de células germinales primordiales. El término "célula germinal embrionaria" se utiliza para describir las células de la presente invención que muestran un fenotipo celular pluripotente embrionario. Los términos "célula germinal embrionaria (EG) humana" o "célula germinal embrionaria" pueden usarse indistintamente en este documento para describir células de mamífero, preferiblemente humanas, o sus líneas celulares, de la presente invención que muestran un fenotipo de células madre embrionarias pluripotentes como se define en este documento. Por tanto, las células EG son capaces de diferenciarse en células de las capas germinales ectodérmica, endodérmica y mesodérmica. Las células EG también pueden caracterizarse por la presencia o ausencia de marcadores asociados con sitios de epítomos específicos identificados mediante la unión de anticuerpos en particular y la ausencia de determinados marcadores según se identifica por la ausencia de unión de determinados anticuerpos.

- [0036]** "Pluripotente" se refiere a células que retienen el desarrollo potencial para diferenciarse en una amplia variedad de estirpes celulares que incluyen la línea germinal. Los términos "fenotipo de célula madre embrionaria" y "célula similar a madre embrionaria" también se usan indistintamente en este documento para describir células que están indiferenciadas y, por tanto, son células pluripotentes y que son capaces de distinguirse visualmente de otras células adultas del mismo animal.
- [0037]** Están incluidas en la definición de células ES las células embrionarias de diversos tipos, ejemplarizadas por células madre embrionarias de primates, como células madre de macaco Rhesus (Thomson y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7844), células madres de tití (Thomson y col., Biol. Reprod. 55 (1996), 254).
- [0038]** Las "células nodrizas" o "nodrizas" son términos utilizados para describir células de un tipo que se cocultivan con células de otro tipo, para proporcionar un entorno en el que las células del segundo tipo pueden crecer. Las células nodrizas son opcionalmente de una especie diferente a las células de las que son auxiliares. Por ejemplo, determinados tipos de células ES pueden estar ayudadas por fibroblastos embrionarios primarios de ratón, fibroblastos embrionarios de ratón inmortalizados (como células STO murinas, por ejemplo, Martin y Evans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975), 1441-1445), o células similares a fibroblastos humanos diferenciados a partir de células ES humanas, como se describe más adelante en esta memoria descriptiva. El término "células STO" hace referencia a fibroblastos murinos embrionarios como los disponibles en el mercado e incluya a las depositadas como ATCC CRL 1503.
- [0039]** El término "cuerpos embrioides" (EB) es un término de la técnica sinónimo de "cuerpos agregados". Los términos se refieren a agregados de células diferenciadas e indiferenciadas que aparecen cuando las células ES crecen en exceso en cultivos monocapa, o se mantienen en cultivos en suspensión. Los cuerpos embrioides son una mezcla de diferentes tipos celulares, típicamente a partir de varias capas germinales, distinguibles por criterios morfológicos; véase también *infra*.
- [0040]** Los términos "polinucleótido" y "molécula de ácido nucleico" se refieren a un polímero de nucleótidos de cualquier longitud. Se incluyen genes y fragmentos génicos, ARNm, ARNt, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN y ARN aislados, sondas de ácido nucleico y cebadores. Según se usa en esta memoria descriptiva, el término polinucleótidos hace referencia de forma indistinta a moléculas de cadena doble y sencilla. Siempre que no se especifique o requiera otra cosa, cualquier realización de la invención que es un polinucleótido abarca tanto una forma de cadena doble como cada una de las dos formas de cadena sencilla complementarias conocidas o que se prevé constituyen la forma de doble cadena. Se incluyen análogos de ácido nucleico como fosforamidatos y tiofosforamidatos.
- [0041]** Se dice que una célula está "genéticamente alterada", "transfectada" o "genéticamente transformada" cuando un polinucleótido se ha transferido dentro de la célula mediante cualquier medio adecuado de manipulación artificial o cuando la célula es una progenie de la célula originalmente alterada que ha heredado el polinucleótido. El polinucleótido comprenderá a menudo una secuencia transcribible que codifique una proteína de interés, que permita a la célula expresar la proteína a un nivel elevado. Se dice que la alteración genética es "hereditaria" si la progenie de la célula alterada tiene la misma alteración.
- [0042]** Una "secuencia reguladora" o "secuencia control" es una secuencia de nucleótidos implicada en una interacción de moléculas que contribuye a la regulación funcional de un polinucleótido, como replicación, duplicación, transcripción, ajuste, traducción o degradación del polinucleótido. Entre los elementos de control transcripcional se incluyen promotores, potenciadores y represores.
- [0043]** Las secuencias génicas particulares referidas como promotores, como el promotor "αMHC" o "colágeno", son secuencias de polinucleótidos derivadas del gen de referencia en que promueven la transcripción de un producto de expresión del gen al que se unen de forma operativa. Se reconoce que diversas porciones de la secuencia génica antes del extremo 5' y del intrón no traducido pueden en determinadas circunstancias contribuir a promover la actividad y que todos o cualquier subgrupo de estas porciones pueden estar presentes en la construcción obtenida por ingeniería genética a la que se refieren. El promotor puede basarse en la secuencia génica de cualquier especie que tenga el gen, siempre que no esté explícitamente restringido, y puede incorporar cualquier adición, sustitución o delección que se desee, siempre que mantenga la capacidad para promover la transcripción en el tejido diana. Las construcciones genéticas diseñadas para el tratamiento de humanos típicamente comprenden un segmento que es al menos el 90% idéntico a una secuencia promotora de un gen humano. Puede

comprobarse la actividad y especificidad de una secuencia en particular, por ejemplo, mediante su unión de forma operativa a un gen indicador; véase la figura 1.

5 **[0044]** Se dice que los elementos genéticos está "unidos de forma operativa" si están en una relación estructural que les permita funcionar de acuerdo con su función prevista. Por ejemplo, si un promotor ayuda a iniciar la transcripción de la secuencia codificadora, la secuencia codificadora puede referirse como unida de forma operativa (o bajo su control) al promotor. Puede haber secuencias intermedias entre el promotor y la región codificadora siempre que se mantenga su relación funcional.

10 **[0045]** En el contexto de las secuencias codificadoras, promotores y otros elementos genéticos, el término "heterólogo" indica que el elemento deriva de una entidad genéticamente diferenciada del resto de la entidad con la que se está comparando. Por ejemplo, un promotor o gen introducido por técnicas de ingeniería genética en un animal de una especie diferente se dice que es un polinucleótido heterólogo. Un elemento genético "endógeno" es un elemento que está en el mismo lugar en el cromosoma en el que se encuentra en la naturaleza, aunque pueden haberse introducido artificialmente otros elementos en una posición vecina.

15 **[0046]** Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma indistinta en esta memoria descriptiva para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede comprender aminoácidos modificados, puede ser lineal o ramificado y puede estar interrumpido por no aminoácidos.

20 **Descripción detallada de las realizaciones de la presente invención**

[0047] La presente invención se refiere a las realizaciones según se caracteriza en las reivindicaciones y no se refiere al uso de células derivadas de un embrión humano.

25 **[0048]** En un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de modelado y/u obtención de tejido cardíaco o estructuras similares a tejido que comprende cultivar un primer tipo celular derivado de células madre embrionarias (ES) en presencia de al menos un segundo tipo celular embrionario, y permitir la integración y alineamiento de dichas al menos dos tipos celulares en el tejido o estructuras similares a tejido.

30 **[0049]** La invención puede ponerse en práctica usando células madre de cualquier especie de vertebrados. Esto incluye células madre de humanos siempre que las células no deriven de un embrión humano así como de primates no humanos, animales domésticos, ganado y otros mamíferos no humanos. Entre las células madre adecuadas para su uso en esta invención se encuentran células madre pluripotentes de primate derivadas de tejidos formados tras la gestación, como blastocitos, o tejido fetal o embrionario obtenido en cualquier momento durante la gestación. Son ejemplos no limitantes los cultivos primarios o líneas estabilizadas de células madre embrionarias. La invención también es aplicable a células madre adultas. Esto hace referencia a la literatura de Anderson y col., Nat. Med. 7 (2001), 393-395 y Anderson y col., 2001, Gage, F.H., 200 y Prockop, Science 276 (1997), 71-74, donde se describe la extracción y cultivo de estas células.

40 **[0050]** Los medios para el aislamiento y propagación de células madre pueden tener varias fórmulas diferentes siempre que las células obtenidas tengan las características deseadas y pueden propagarse adicionalmente. Entre las fuentes adecuadas se incluyen medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), N.º de cat. de Gibco: 12440-053; medio de Eagles modificado por Dulbecco (DMEM), N.º de cat. de Gibco: 11965-092; medio de Eagles modificado por Dulbecco para genes silenciados (KO DMEM), N.º de cat. de Gibco: 10829-018; L-glutamina 200 mM, N.º de cat. de Gibco: 15039-027; solución de aminoácidos no esenciales, N.º de cat. de Gibco: 11140-050; [beta]-mercaptoetanol, N.º de cat. de Sigma: M7522; factor de crecimiento de fibroblastos básico recombinante (bFGF), N.º de cat. de Gibco: 13256-029. Se conocen ejemplos de medios y condiciones para ES que contienen suero para el cultivo de células madre y pueden optimizarse de forma apropiada según el tipo celular. En las referencias citadas en este documento se proporcionan medios y técnicas de cultivo para los tipos celulares en particular referidos en la sección previa.

55 **[0051]** Como se mencionó anteriormente, los expertos en la materia disponen de varias fuentes de células ES. Pueden aislarse células madre embrionarias a partir de blastocitos de miembros de las especies de primates (Thomson y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7844).

[0052] Recientemente, se ha notificado que el diente caduco humano exfoliado, un tejido comparable muy accesible, contiene células madre multipotentes que se identificaron como una población de células clonogénicas con alta capacidad proliferativa capaces de diferenciarse en diversos tipos celulares incluidos células neuronales,

adipocitos y odontoblastos, véase Miura y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003), 5807-5812. Tras el trasplante *in vivo*, se encontró que estas células eran capaces de inducir formación ósea, generar dentina y sobrevivir en el cerebro de ratón junto con la expresión de marcadores neuronales. Adicionalmente, Lin y col. en Stem Cells 21 (2003), 152-161 han descrito el potencial multiestirpe de las células madre homocigotas de ovocitos en metafase II.

- 5 Se revisan varias fuentes de células precursoras en músculos postnatales y los factores que pueden potenciar la participación de células madre en la formación de nuevo esqueleto y músculo cardíaco *in vivo* en Grounds y col., J. Histochem. Cytochem. 50 (2002), 586-610. La purificación de células madre hematopoyéticas (HSC) raras a homogeneidad que se alojan en la médula ósea se describe en la solicitud de EE. UU. US2003/0032185. Se describe que estas células de médula ósea adultas tienen una enorme capacidad de diferenciación ya que también
- 10 pueden diferenciarse en células epiteliales del hígado, pulmón, tracto digestivo y piel. Este hallazgo puede contribuir al tratamiento clínico de la enfermedad genética o a la reparación tisular. Adicionalmente, pueden emplearse técnicas como la transferencia nuclear para la reconstrucción de embriones en las que se trasplantan núcleos donantes diploides en ovocitos MII enucleados. Esta tecnología junto con otros procedimientos que ayudan al establecimiento de líneas celulares madre embrionarias (ES) modificadas que son genéticamente idénticas a las del
- 15 receptor se ha revisado en Colman y Kind, Trends. Biotechnol. 18 (2000), 192-196. Para evitar el rechazo del implante asociado con células alogénicas o xenogénicas en el trasplante, se usan preferiblemente células o receptores singénicos o autólogos en las realizaciones correspondientes de la invención. A la vista de las fuentes de células madre recientemente descubiertas como las de médula ósea y dientes, sería posible cumplir esta demanda sin necesidad de recurrir a células y tejido embrionario. Alternativamente, las células pueden manipularse
- 20 genéticamente para suprimir antígenos de trasplante relevantes, véase también *infra*, pueden usarse agentes inmunodepresores.

[0053] El campo de la tecnología de células madre está siendo revisado por Kiessling y Anderson, Harvard Medical School, en Human Embryonic Stem Cells: An Introduction to the Science and Therapeutic Potential; (2003) Jones y Bartlett Publishers; ISBN: 076372341X.

[0054] Para evitar el uso de, por ejemplo, embriones humanos como donantes de células madre, puede ser posible incluso emplear animales transgénicos no humanos, en especial mamíferos, como fuente de células madre embrionarias. Por ejemplo, en la patente de EE. UU. 5 523 226 se describen composiciones y procedimientos para

30 obtener cerdos transgénicos para su uso como donantes xenógrafos. Así mismo, en la solicitud internacional WO97/12035 se describen procedimientos de producción de animales transgénicos para xenotrasplante. Adicionalmente, en la solicitud internacional WO01/88096 se describe un tejido animal inmunológicamente compatible, adecuado para xenotrasplante en pacientes humanos. Los procedimientos para obtener células germinales embrionarias a partir de cerdo se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 6 545 199.

[0055] Las células madre pueden propagarse de forma continua en cultivo, usando una combinación de condiciones de cultivo que promueven la proliferación sin promover la diferenciación. Tradicionalmente, las células madre se cultivan sobre una capa de células nodrizas, típicamente células de tipo fibroblasto, a menudo derivadas de tejido embrionario o fetal. Las líneas celulares se crecen en placas hasta prácticamente la confluencia,

40 normalmente se irradian para evitar su proliferación y, a continuación, se usan como apoyo para el cultivo en medio condicionado de determinadas células (p. ej., Koopman y Cotton, Exp. Cell 154 (1984), 233-242; Smith y Hooper, Devel. Biol. 121 (1987), 1-91) o mediante la adición exógena de factor inhibidor de leucemia (LIF). Estas células pueden crecer de forma relativamente indefinida usando las condiciones de cultivo apropiadas.

[0056] En la solicitud internacional WO03/01303 y en Mummery y col., Circulation 107 (2003), 2733-2740, se describen experimentos con células madre embrionarias humanas (hES) que se diferencian a cardiomiocitos, donde dichas células hES se cocultivan con células similares a endodermo visceral (VE) de ratón. En esos experimentos las células de endodermo de ratón sustituyen a las células nodrizas de tipo fibroblasto de ratón utilizadas normalmente y se usan para la inducción de diferenciación de cardiomiocitos en células hES que no sufren

50 cardiogénesis espontánea.

Por consiguiente, Mummery y col. no muestran un procedimiento para proporcionar tejido o estructuras similares a tejido que permita la integración y alineamiento de dichas células de endodermo con las células hES. Por el contrario, el uso de células de endodermo de ratón indica de hecho que estas desaparecen cuando se utilizan los

55 cardiomiocitos diferenciados para aplicaciones adicionales incluido el trasplante. También en contraste con esto, los procedimientos de la presente invención emplean típicamente células madre y células embrionarias procedentes de la misma especie, más preferiblemente de humanos.

[0057] En ausencia de células nodrizas, factor inhibidor de leucemia (LIF) exógeno o medio condicionado, las

células ES o EG se diferencian de forma espontánea en una amplia variedad de tipos celulares, incluidas células que se encuentran en alguna de las capas germinales del endodermo, mesodermo y ectodermo. No obstante, con las combinaciones apropiadas de crecimiento y factores de diferenciación, puede controlarse la diferenciación celular. Por ejemplo, las células ES y EG de ratón pueden generar células de la estirpe hematopoyética *in vitro* (Keller y col., *Mol. Cell Biol.* 13 (1993), 473-486; Palacios y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995), 7530-7534; Rich, *Blood* 86 (1995), 463-472). Adicionalmente, se han utilizado células ES de ratón para generar *in vitro* cultivos de neuronas (Bain y col., *Developmental Biology* 168 (1995), 342-357; Fraichard y col., *J. Cell Science* 108 (1995), 3161-3188), cardiomiocitos (células de músculo cardíaco) (Klug y col., *Am. J. Physiol.* 269 (1995), H1913-H1921), células de músculo esquelético (Rohwedel y col., *Dev. Biol.* 164 (1994), 87-101), células vasculares (Wang y col., *Development* 114 (1992), 303-316). La patente de EE. UU. 5 773 255 se refiere a líneas celulares beta pancreáticas secretoras de insulina sensibles a la glucosa, la patente de EE. UU. 5 789 246 se refiere a células precursoras de hepatocitos. La diferenciación hepática de células madre embrionarias murinas también se describe en Jones y col., *Exp. Cell Res.* 272 (2002), 15-22.

15 Entre otros progenitores de interés se incluyen, pero sin limitaciones, condrocitos, osteoblastos, células del epitelio pigmentario retiniano, fibroblastos, células cutáneas como queratinocitos, células dendríticas, células del folículo piloso, células epiteliales de los conductos renales, células de músculo liso y esquelético, progenitores testiculares y células del endotelio vascular. Generalmente se han descrito modelos de diferenciación de células madre embrionarias para cardiogénesis, miogénesis, neurogénesis, diferenciación de músculo liso epitelial y vascular *in vitro* en Guan y col., *Cytotechnology* 30 (1999), 211-226.

[0058] En determinadas realizaciones de la invención, la diferenciación está promovida por la retirada de uno o más componentes del medio que promueven el crecimiento de células indiferenciadas, o actúan como inhibidores de la diferenciación. Entre los ejemplos de estos componentes se incluyen determinados factores de crecimiento, mitógenos, factor inhibidor de leucocitos (LIF) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). La diferenciación puede también promoverse mediante la adición de un componente al medio que promueve la diferenciación hacia el linaje celular deseado, o inhiba el crecimiento de células con características no deseadas.

[0059] Según la invención, las poblaciones de células diferenciadas carecen de células relativamente indiferenciadas y/o de células de tipos celulares no deseados mediante el uso de un sistema de selección que es letal para las células y tipos celulares no deseados, es decir, expresando un gen marcador seleccionable que hace a las células de tipo celular específico resistentes al efecto letal de un agente externo, bajo el control de una secuencia reguladora que hace que el gen se exprese de forma preferente en el tipo celular deseado y/ o en un determinado estadio de desarrollo. Para conseguir esto, las células se alteran genéticamente antes del proceso utilizado para diferenciar las células en el linaje deseado para el tratamiento, de modo que las células comprendan un marcador seleccionable unido de forma operativa a una primera secuencia reguladora específica de tipo celular específica para el primer tipo celular deseado. En la figura 1 se muestra un ejemplo de construcción.

[0060] Puede utilizarse cualquier tipo de vector de expresión adecuado. Los sistemas de vectores virales adecuados para la producción de células madre alteradas según esta invención pueden prepararse usando componentes víricos disponibles en el mercado. La introducción de la construcción o construcciones de vectores en las células madre se produce de manera conocida, por ejemplo, mediante transfección, electroporación, lipofección o con ayuda de vectores virales. Los vectores virales que comprenden genes efectores generalmente se describen en las publicaciones referidas en la última sección. Alternativamente, pueden introducirse plásmidos vectores en las células mediante electroporación, o usando complejos lípido/ADN. Un ejemplo es la formulación Lipofectamine 2000 (TM), disponible en Gibco/Life Technologies. Otro ejemplo de reactivo es el reactivo de transfección FuGENE (tm) 6, una mezcla de lípidos en forma no liposomal y otros compuestos en etanol al 80%, que se obtiene de Roche Diagnostics Corporation. Preferiblemente, se usan las construcciones de vector y los procedimientos de transfección descritos en la solicitud internacional WO021051987.

[0061] Los genes de resistencia se conocen *per se*. Son ejemplos de estos los genes de resistencia a antibióticos nucleósidos y aminoglucósidos para, por ejemplo, puromicina (puromicina-N-acetiltransferasa), estreptomina, neomicina, gentamicina o higromicina. Son ejemplos adicionales de genes de resistencia la dehidrofolato reductasa que confiere resistencia frente a aminopterina y metotrexato, así como genes de resistencia a múltiples fármacos, que confieren resistencia frente a varios antibióticos, por ejemplo, frente a vinblastina, doxorubicina y actinomicina D.

En una realización especialmente preferida de la presente invención, dicho marcador seleccionable confiere resistencia a puromicina. La puromicina es especialmente adecuada para la eliminación rápida de células no

cardíacas en cultivos adherentes de EB transgénicas. Adicionalmente, la selección de fármacos de células cardíacas puede implementarse por completo en el cultivo en suspensión de EB transgénicas. Por tanto, también se podría mostrar que los cardiomiocitos derivados de células ES purificados sobreviven mucho más en cultivo que sus homólogos sin tratar. Además, se ha demostrado que la eliminación de células ES indiferenciadas durante el proceso de selección con fármacos en sí tiene un efecto positivo claro sobre la viabilidad y longevidad de dichas células derivadas de células ES diferenciadas como cardiomiocitos. Además, podría mostrarse de forma sorprendente que la liberación a partir de células no diferenciadas circundantes induce proliferación de cardiomiocitos. Por tanto, la selección por fármacos posee ambos efectos purificador y multiplicador.

10 **[0062]** En una realización preferida de la invención, dicha célula ES de dicho primer tipo celular derivado de células ES comprende un gen indicador, donde dicho indicador está unido de forma operativa a una secuencia reguladora específica de tipo celular específico para dicho primer tipo celular. Este tipo de vector tiene ventajas de proporcionar visualización de diferenciación, definición de punto temporal para el inicio de la selección por fármaco, visualización de la selección por fármaco y seguimiento del destino de las células purificadas implantadas en el tejido receptor. Dichos vectores, que se emplean preferiblemente según los procedimientos de la presente invención, se describen en la solicitud internacional WO02/051987. Normalmente, dicha secuencia reguladora específica de tipo celular del gen indicador es sustancialmente la misma que dicha primera secuencia reguladora específica de tipo celular del gen marcador. Esto puede conseguirse de forma ventajosa colocando dicho gen marcador y dicho gen indicador en la misma molécula de ácido nucleico recombinante, es decir, el vector usado para la transfección de la célula madre, preferiblemente de modo que dicho gen marcador y dicho gen indicador están contenidos en el mismo cistrón. En la figura 1 se muestra un ejemplo de un vector casete de resistencia a fármacos - indicador específico cardíaco dicistrónico. El indicador puede ser de cualquier tipo siempre que no sea dañino para la célula y confiera un fenotipo observable o cuantificable. Según la presente invención, pueden usarse la proteína verde fluorescente (GFP) de la medusa *Aequorea victoria* (descrita en las solicitudes internacionales WO95/07463, WO96/27675 y WO95/121191) y sus derivados "Blue GFP" (Heim y col., Curr. Biol. 6 (1996), 178-182 y "Redshift GFP" (Muldoon y col., Biotechniques 22 (1997), 162-167). Es especialmente preferida la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP). Son realizaciones adicionales las proteínas amarilla y ciano fluorescentes potenciadas (EYFP y ECFP, respectivamente) y las proteínas rojas fluorescentes (DsRed, HcRed). Los expertos en la materia conocen otras proteínas fluorescentes que pueden usarse según la invención siempre que no dañen a las células. La detección de proteínas de fluorescencia se produce mediante procedimientos de detección de fluorescencia conocidos *per se*; véase por ejemplo, Kolossov y col., J. Cell Biol. 143 (1998), 2045-2056. Alternativamente a las proteínas fluorescentes, especialmente en aplicaciones *in vivo*, también pueden usarse especialmente epítopes de esas proteínas. También puede usarse el epítipo de proteínas, aunque capaz de dañar la célula *per se*, pero aquellos epítopes que no dañan a las células; véase también la solicitud internacional WO02/051987.

35 **[0063]** Para la selección de células ES transfectadas de forma estable las construcciones de vector contienen un gen marcador seleccionable adicional que confiere, por ejemplo, resistencia frente a un antibiótico, por ejemplo, neomicina. Por supuesto, también pueden usarse otros genes de resistencia conocidos, por ejemplo, los genes de resistencia descritos anteriormente en asociación con los genes que codifican proteínas fluorescentes. El gen de selección para la selección de células ES transfectada de forma estable está bajo el control de un promotor diferente del que regula el control de la expresión de la proteína detectable. A menudo se utilizan promotores constitutivamente activos, por ejemplo, el promotor PGK.

45 El uso de un segundo gen de selección es ventajoso por la capacidad de identificar los clones transfectados de forma completamente exitosa (la eficiencia es relativamente baja). De lo contrario puede producirse una mayoría asfixiante de células ES no transfectadas y durante la diferenciación, por ejemplo, podrían no detectarse células positivas para EGFP.

50 En una realización adicional de la invención las células pueden manipularse adicionalmente, de modo que no se formen los tejidos específicos. Esto se produce verbigracia, insertando elementos represores, por ejemplo, un elemento represor inducible por doxiciclina. De este modo, puede excluirse una posible contaminación de las células diferenciadas deseadas con células pluripotentes potencialmente tumorigénicas.

[0064] El primer tipo de células deseado pretendido para que se diferencien las células madre puede ser de cualquier tipo e incluye, sin limitaciones, células neuronales, células gliales, cardiomiocitos, células beta pancreáticas secretoras de insulina sensibles a glucosa, hepatocitos, astrocitos, oligodendrocitos, condrocitos, osteoblastos, células epiteliales pigmentadas retinianas, fibroblastos, queratinocitos, células dendríticas, células del folículo piloso, células epiteliales del conducto renal, células del endotelio vascular, progenitores del testículo, células de músculo liso y esquelético; véase también *supra*.

[0065] De acuerdo con la invención, dicho primer tipo celular son cardiomiocitos. Para esta realización, dicha primera secuencia reguladora específica de tipo celular es preferiblemente específica de aurícula y/o de ventrículo. Se describen secuencias reguladoras correspondientes, es decir, promotores específicos cardíacos, para Nkx-2.5 específico para cardiomiocitos muy precoces y células precursoras mesodérmicas, respectivamente (Lints y col., Development 119 (1993), 419-431); α -actina cardíaca humana específica de tejido cardíaco (Sartorelli y col., Genes Dev. 4 (1990), 1811-1822) y MLC-2V específica para células de músculo cardíaco ventricular (O'Brien y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (1993), 5157-5161 y la solicitud internacional WO96/16163). Un promotor de la cadena pesada de la alfa-miosina específica cardíaca se describe en Palermo y col., Cell Mol. Biol. Res. 41 (1995), 501-519; Gulick y col., J. Biol. Chem. 266 (1991), 9180-91855; el promotor de la cadena ligera 2v de miosina (MLC2v) también en Lee y col., Mol. Cell Biol. 14 (1994), 1220-1229; Franz y col., Circ. Res. 73 (1993), 629-638; véase también la expresión de la cadena pesada de la miosina específica de aurícula AMHC1 y el establecimiento de polaridad anteroposterior en el corazón de pollo en desarrollo en Yutzey y col., Development 120 (1994), 871-883.

15 **[0066]** Müller y col. describen la selección de cardiomiocitos similares a los ventriculares a partir de células ES *in vitro* usando la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) bajo el control de transcripción del promotor de la cadena ligera de miosina 2v (MLC-2v) de 2,1 kb específica de ventrículo y el elemento potenciador de 0,5 kb del citomegalovirus (CMV(enh)); véase Müller y col., FASEB J. 14 (2000), 2540-2548. En esta publicación también se describen estudios electrofisiológicos que pueden realizarse de forma similar con el tejido y las estructuras similares a tejido generadas *in vitro* de la presente invención.

[0067] Especialmente según las realizaciones relacionadas con los cardiomiocitos diferenciados *in vitro*, se prefiere el uso de fibroblastos como dicho al menos un segundo tipo celular embrionario. Como se muestra en los ejemplos, el cocultivo y cotrasplante, respectivamente de cardiomiocitos derivados de células ES y fibroblastos embrionarios da lugar a la formación de tejido cardíaco y a una terapia de sustitución exitosa. Puede que no sea necesario que dichos fibroblastos deriven de embriones sino que también pueden generarse *de novo* a partir de células ES según el procedimiento de la presente invención. Por tanto, se transfectan células ES con una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un marcador y, opcionalmente, un gen indicador unidos de forma operativa a una secuencia reguladora específica de tipo celular, es decir, un promotor específico de fibroblastos como el promotor de colágeno $\alpha 2$ (I) que también se activa en células óseas (Lindahl y col., J. Biol. Chem. 277 (2002), 6153-6161; Zheng y col., Am. J. Pathol. 160 (2002), 1609-1617; Antoniv y col., J. Biol. Chem. 276 (2001), 21754-21764; véase también Finer y col., J. Biol. Chem. 262 (1987), 13323-13333; Bou-Gharios y col., J. Cell Biol. 134 (1996), 1333-1344; Zheng y col., Am. J. Pathol. 160 (2002), 1609-1617; Metsaranta y col., J. Biol. Chem. 266 (1991) 16862-16869).

35 No obstante, para otras realizaciones pueden utilizarse fibroblastos así como y/o alternativamente otras células auxiliares como células endoteliales, etc., y derivados de las mismas.

En una realización adicional preferida, el procedimientos de la presente invención además comprende cultivar dichos al menos dos tipos celulares en presencia de un tercer tipo celular embrionario o derivados de células madre (ES) embrionarias, siempre que estas células no deriven de un embrión humano. Dicho tercer tipo de células puede ser cualquier tipo celular mencionado anteriormente. Preferiblemente, dicho tercer tipo celular son células endoteliales. Por tanto, pueden usarse células endoteliales embrionarias o células endoteliales derivadas de células ES. En esta última realización, dichas células endoteliales derivan de células ES transfectadas con una construcción de vector como se ha descrito en general antes, donde dicha secuencia reguladora específica de tipo celular es un promotor específico endotelial; véase, por ejemplo, el promotor de cadherina del endotelio vascular descrito por Gory y col., Blood 93 (1999), 184-192; el promotor/potenciador de Tie-2 descrito por Schaefer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 3058-3063 y el promotor/potenciador de Flk-1 descrito por Kappel y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 276 (2000), 1089-1099.

50 **[0068]** Se conocen otros promotores específicos de tipo celular y tejido; véase, por ejemplo, el fragmento promotor de la cadena de colágeno (colágeno 2) proalfa (II), específico de condrocitos descrito por Zhou y col., J. Cell. Sci. 108 (1995), 3677-3684; el promotor específico de alfa-1-tubulina neuronal descrito en Gloster y col., J. Neurosci. 14 (1994), 7319-7330 y el promotor de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) descrito en Besnard y col., J. Biol. Chem. 266 (1991), 18877-18883. Ejemplos adicionales de promotores específicos de tejido son aquellos que están activos en células de la glia, células hematopoyéticas, células neuronales, preferiblemente células neuronales embrionarias, células endoteliales, células de cartílago o células epidérmicas, así como en células β secretoras de insulina. "Específico de tejido" se integra bajo el término "específico de célula",

[0069] Son ejemplos adicionales de promotores no específico de corazón: PECAM1, FLK-1 (endotelio), nestina (células precursoras neuronales), promotor de tirosina-hidroxilasa-1 (neuronas dopaminérgicas), α -actina de músculo liso, miosina de músculo liso (músculos lisos), α 1-fetoproteína (endodermo), promotor mínimo de la cadena pesada de músculo liso (SMHC) (específico de músculos lisos, Kallmeier y col., J. Biol. Chem. 270 (1995), 30949-5 30957).

[0070] El término promotor específico de desarrollo se refiere a promotores que se activan en determinados puntos temporales durante el desarrollo. Ejemplos de dichos promotores son el promotor β -MHC que se expresa durante de desarrollo embrionario en el ventrículo del ratón y es sustituido por el promotor α -MHC en la fase prenatal. NKx2.5, promotor durante el desarrollo temprano del mesodermo cardíaco, factor natriurético auricular, marcador de corazón embrionario inicial con excepción del marcapasos que también se regula por disminución en los estadios tardíos del desarrollo, Flk-1, un promotor específico de endotelio activo durante la vasculogénesis inicial, el segmento del intrón 2 del gen de la nestina que se expresa en células precursoras neuronales (neuronas embrionarias y células de glía) y células de glía adultas (que siguen siendo parcialmente capaces de dividirse) (Lothian y Lendahl, Eur. J. Neurosci. 9 (1997), 452-462U).

[0071] En las realizaciones mencionadas se usan preferiblemente los vectores mencionados en las figuras 1 a 3.

[0072] La presente invención también se refiere a cocultivos de células según se define en los procedimientos descritos a continuación en este documento así como a tejido que puede obtenerse mediante el procedimiento de la invención. Las células y tejido preparados según esta invención pueden usarse para diversos fines de investigación, diagnóstico y terapéuticos importantes desde un punto de vista comercial. Debido a que las poblaciones celulares de esta invención carecen de células indiferenciadas, pueden usarse para preparar anticuerpos y bibliotecas de ADNc que son específicos para el fenotipo diferenciado. Las técnicas generales utilizadas en la obtención, purificación y modificación de anticuerpos y su uso en inmunoensayos y procedimientos de inmunoaislamiento se describen en Handbook of Experimental Immunology (Weir y Blackwell eds.); Current Protocols in Immunology (Coligan y col., eds) y Methods of Immunological Analysis (Masseyeff y col., eds, Weinheim: VCH Verlags GmbH). Las técnicas generales implicadas en la preparación de bibliotecas de ARNm y ADNc se describen en RNA Methodologies A Laboratory Guide for Isolation and Characterization (R. E. Farrell, Academic Press, 1998); cDNA Library Protocols (Cowell & Austin, eds., Humana Press) y Functional Genomics (Hunt & Livesey, eds., 2000).

[0073] Un objeto principal de la presente invención es, no obstante, la provisión de células y tejido cardíaco para su uso en trasplante. Por ejemplo, las 23 células diferenciadas de esta invención pueden usarse para la reconstitución o regeneración tisular en un paciente humano: desarrollo ectodérmico embrionario (eed) del mismo. Las células se administran de forma que se permite que se implanten en el sitio del tejido deseado y reconstituyan o regeneren la zona funcionalmente deficiente. Por tanto, la presente invención se refiere en particular a un procedimiento para mejorar la reparación del tejido cardíaco y/o la función del órgano en un mamífero que comprende las etapas de:

(a) introducir un inóculo celular que comprende un cocultivo de células madre preferiblemente transgénicas en el que se ha iniciado la diferenciación o el tejido correspondiente al menos en una porción del área previamente dañada del tejido, y

(b) permitir que dicho inóculo celular introducido se implante *in situ* como células o tejido viables situados dentro del área previamente dañada del tejido, donde el implante tiene como resultado una mejora del tejido y/o la función del órgano en dicho mamífero, siempre que las células no deriven de un embrión humano.

[0074] Se utilizan ejemplos seleccionados para ilustrar el potencial de las células madre, tanto en el sentido de su capacidad para diferenciarse en tipos celulares específicos como en el sentido de su poder para tratar diversas enfermedades y afecciones como la enfermedad de Parkinson, lesiones de la médula espinal, diabetes y enfermedad cardíaca que se han revisado en Pfindler y Kawase en Obstet. Gynecol. Surv. 58 (2003), 197-208. Todas esas afecciones pueden tratarse utilizando las células y tejido descritos anteriormente.

[0075] En un aspecto en particular, la presente invención se refiere a un procedimiento para mejorar notablemente la función cardíaca y reparar el tejido cardíaco en un sujeto mamífero vivo tras un caso de infarto de miocardio o daño tisular. El procedimiento es una técnica quirúrgica con la que se introducen e implantan células madre embrionarias, es decir, cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias de mamífero junto con

células embrionarias auxiliares como fibroblastos embrionarios en la zona infartada o dañada del miocardio. Tras la implantación, las células forman implantes estables y sobreviven indefinidamente dentro de la zona infartada o dañada del corazón de huésped vivo. Entre los efectos beneficios demostrados del procedimiento se incluyen una disminución de la zona infartada y la mejora de la función cardíaca; véase la figura 6.

5

[0076] Por tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento para mejorar la función cardíaca en un mamífero tras un infarto de miocardio, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

(a) cultivar células madre embrionarias (ES) de mamíferos indiferenciadas que comprenden un gen de resistencia y un gen indicador bajo el control del mismo promotor específico cardíaco *in vitro* en un medio de cultivo que contiene el agente selectivo para el gen de resistencia en condiciones que permiten la diferenciación de dichas células ES en cardiomiocitos;

(b) aislar dichos cardiomiocitos diferenciados y/o eliminar las células no diferenciadas, opcionalmente junto con células que se diferencian en tipos células irrelevantes a partir de dichos cardiomiocitos en el transcurso de la diferenciación;

(c) cotrasplantar posteriormente dichos cardiomiocitos con fibroblastos embrionarios o derivados de células ES y/o células endoteliales en al menos una porción de la zona previamente infartada del tejido cardíaco; y

20

(d) permitir que dicho inóculo celular introducido se implante *in situ* como células viables situadas dentro del área previamente infartada del tejido cardíaco, donde el implante tiene como resultado una mejora de la función cardíaca en dicho mamífero, siempre que las células no deriven de un embrión humano.

[0077] De forma similar a las realizaciones descritas anteriormente en este documento, dicho gen de resistencia y dicho gen indicador están contenidos en un vector bicistrónico y están preferiblemente separados por un IRES. Es especialmente preferido el uso de una construcción, en la que dicho gen de resistencia confiere resistencia a puromicina, dicho marcador es EGFP y dicho promotor es el promotor α MHC cardíaco; véase la figura 3. La implantación de células madre embrionarias en las que se ha iniciado la diferenciación y la determinación de la función cardíaca puede realizarse como se describe en los ejemplos y referencias citadas o, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. 6 534 052.

[0078] En la patente de EE. UU. 5 733 727 se describen implantes miocárdicos de mioblastos esqueléticos o cardiomiocitos, y composiciones y procedimientos celulares útiles para obtener los implantes. Esos implantes miocárdicos se describen como estables y útiles, por ejemplo, para la administración de proteínas recombinantes directamente al corazón. Aunque en esta patente de EE. UU. solo se describe la estrategia común de generar cardiomiocitos a partir de células ES y su uso en trasplante y como vehículo para la administración de proteínas recombinantes al corazón, sus conclusiones pueden aplicarse al tejido y a estructuras similares a tejido obtenidas según la presente invención. Por tanto, en especial la estructura similar a tejido cardíaco generado *in vitro* de la presente invención puede usarse para la administración de proteínas terapéuticas, como factores angiogénicos (como por ejemplo, el factor de crecimiento de fibroblastos básico y ácido, factor de crecimiento transformante β , factor de crecimiento endotelial vascular y factor de crecimiento de hepatocitos), para inducir la neovascularización. De forma similar los implantes que expresan agentes neurotróficos próximos a la región infartada pueden usarse para mejorar la arritmogénesis asociada con la zona fronteriza. Estas y otras muchas sustancias candidatas para la administración dirigida al corazón serán aparentes para los expertos en la materia.

[0079] Como se mencionó anteriormente, según la presente invención cualquiera de los dichos al menos dos tipos celular es como el tipo celular principal y las células auxiliares correspondientes pueden derivar de células ES. Por tanto, en un aspecto adicional la presente invención se refiere a un procedimiento de formación y/u obtención de tejido cardíaco o estructuras similares a tejido que comprende las siguientes etapas:

(a) transfectar una o más células ES con moléculas de ácido nucleico recombinantes que comprenden una primera y una segunda secuencia reguladoras específicas de tipo celular unidas de forma operativa a al menos un marcador seleccionable, en el que dicho segundo tipo celular es diferente de dicho primer tipo celular;

55

(b) cultivar las células en condiciones que permitan la diferenciación de las células; y

(c) aislar células de al menos dos tipos celulares diferenciados y/o eliminar las células no diferenciadas, opcionalmente junto con células en diferenciación hacia tipos celulares irrelevantes a partir de los tipos celulares de

interés que activen el marcador seleccionable en el transcurso de la diferenciación siempre que las células no deriven de un embrión humano.

[0080] De forma similar a los procedimientos previos, es deseable la generación de más de dos tipos celulares. Por tanto, el procedimiento preferiblemente comprende transfectar dichas una o más células con moléculas de ácido nucleico recombinantes que comprenden al menos una secuencia reguladora específica de tipo celular adicional unido de forma operativa a al menos un marcador seleccionable, donde dicho al menos un tipo celular adicional es diferente de dichos primer y segundo tipos celulares. Para su uso en el procedimiento, dichas moléculas de ácido nucleico recombinantes están incluidas en el mismo vector o en vectores diferentes. El principio detrás de estas opciones se muestra en las figuras 2 y 3 y se explica en los ejemplos.

[0081] El tipo celular puede seleccionarse a partir del grupo compuesto por células neuronales, células gliales, cardiomiocitos, células beta pancreáticas secretoras de insulina sensibles a glucosa, hepatocitos, astrocitos, oligodendrocitos, condrocitos, osteoblastos, células epiteliales pigmentadas retinianas, fibroblastos, queratinocitos, células dendríticas, células del folículo piloso, células epiteliales del conducto renal, células del endotelio vascular, progenitores de testículo, células de músculo liso y esquelético; véase también *supra*.

[0082] Los promotores que se utilizar preferiblemente si se desea la preparación de tejido cardíaco mediante diferenciación de las células madre transfectadas en cardiomiocitos, fibroblastos y, opcionalmente, células endoteliales comprenden los descritos anteriormente en este documento. De forma similar, para producir tejido neuronal pueden usarse una o más células madre, por ejemplo, células madre neuronales multipotentes que se modifican genéticamente según la presente invención para diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Se aplica la misma justificación para la generación de, por ejemplo, tejido hepático o pancreático. Las secuencias reguladoras de los promotores específicos de tipo celular correspondientes pueden obtenerse a partir de la literatura; véase, por ejemplo, "medline" y NCBI.

[0083] Se entenderá que cuando se realiza el procedimiento de la invención, dichas una o más moléculas de ácido nucleico recombinantes pueden transfectarse de forma concomitante o posterior en dichas una o más células.

[0084] Como se explica en los ejemplos y se muestra en las figuras 2 y 3, el procedimiento de la invención puede realizarse de formas diferentes. En primer lugar, como se describe preferentemente en este documento, se transfecta de forma estable un clon múltiple de células ES transgénicas con un determinado número de vectores con un casete de selección por fármaco dirigidos por promotores específicos según los tipos celulares que constituyen el tipo tisular deseado. Por tanto, se transfecta y selecciona al menos una de dichas células ES o clon celular del mismo, donde dicha célula o clon celular contiene moléculas de ácido nucleico recombinantes con al menos dos secuencias reguladoras específicas de tipo celular diferentes. En esta variante todos los tipos celulares emergentes se originan a partir de un clon antecesor común de células ES y la proporción resultante entre los diferentes componentes celulares depende de la velocidad de diferenciación relativa de cada uno de ellos. Alternativamente, se transfectan y seleccionan al menos dos células ES o clones de las mismas diferentes, donde dichas al menos dos células o clones celulares diferentes contienen moléculas de ácido nucleico recombinantes con secuencias reguladoras específicas de tipo celular diferentes. Mediante esta técnica se generan varios clones de células ES transgénicas, donde cada clon individual posee solo un vector con un casete de resistencia a fármacos dirigido por uno de los promotores específicos de tipo celular.

Para la modulación del tejido los clones relevantes se deben mezclar en la fase inicial de diferenciación ("gotas colgantes" o "cultivo en masa") para forma agregados de células ES (EB) donde, tras la selección por fármacos, surgiendo tipos celulares que tienen su origen en los correspondientes diferentes clones celulares de ES y la relación inicial de los componentes celulares también depende y puede controlarse mediante la proporción final entre diferentes líneas células de ES. Este procedimiento preferiblemente da lugar a agregados celulares que son cuerpos embrioides (EB) quiméricos.

[0085] Independientemente de la realización en particular del procedimiento de la invención, se prefiere que los al menos dos de dichos marcadores seleccionables estén unidos de forma operativa a dichas secuencias reguladoras específicas de tipo celular diferentes sean idénticas. Como se mencionó anteriormente, estos marcadores o genes marcadores son, preferiblemente, marcadores seleccionables que confieran resistencia a un agente citotóxico, preferiblemente puromicina, metotrexato o neomicina.

[0086] Como ya se ha descrito con respecto al procedimiento del primer aspecto de la presente invención, dichas una o más de dichas moléculas de ácido nucleico recombinantes preferiblemente comprende además un

indicador unidos de forma operativa a dicha secuencia específica de tipo celular; véase *supra*. También en este documento se prefieren las versiones de diferentes colores de la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP), en especial EYFP (amarilla), ECFP (azul) y/o hCRFP (roja), unida de forma operativa a diferentes secuencias específicas de tipo celular. Del mismo modo se prefiere que dicho marcador seleccionable y dicho indicador se expresa a partir de un vector bicistrónico, preferiblemente en el que dicho marcador seleccionable y dicho indicador están separados por uno o más sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), que están unidos de forma operativa a al menos uno de dichos genes.

[0087] Como se mencionó anteriormente, el procedimiento de la presente invención se realiza preferiblemente de modo que se permite el autoensamblaje de los diferentes tipos celulares, por ejemplo dentro del tejido o estructuras similares a tejido deseados. Las células madres están en una realización preferida de la invención disponibles en forma de agregados que se conocen como cuerpos embrioides. En la solicitud internacional WO02/051987 se describe un protocolo para obtener cuerpos embrioides. La producción tiene lugar preferiblemente con un procedimiento de "gota colgante" o mediante cultivo en metilcelulosa (Wobus y col., *Differentiation* 48 (1991), 172-182).

Alternativamente a esto, pueden utilizarse matraces giratorios (cultivos en agitación) como método de cultivo. Por tanto, las células ES indiferenciadas se introducen en cultivos en agitación y se mezclan de forma permanente según un procedimiento establecido. Por ejemplo, se introducen 10 millones de células ES en 150 ml de medio con FCS al 20% y se agita de forma constante a una velocidad de 20 rpm, donde la dirección del movimiento de agitación se cambia de forma regular. Veinticuatro horas después de introducir las células ES se añaden 10 ml de medio más con suero y, a continuación, se cambian cada día de 100 a 150 ml del medio (Wartenberg y col., *FASEB J.* 15 (2001), 995-1005). En estas condiciones de cultivo pueden obtenerse grandes cantidades de células derivadas de células ES, es decir, cardiomiocitos, células endoteliales, neuronas, etc., dependiendo de la composición del medio. Las células se seleccionan por medio del gen de resistencia siguiendo con el cultivo en agitación o tras la disposición en placas, respectivamente.

[0088] Alternativamente a esto, los EB diferenciados en la gota pendiente pueden no disponerse en placas, sino mantenerse simplemente en suspensión. Incluso en estas condiciones podría observarse experimentalmente una progresión de la diferenciación. La eliminación mediante lavado de los tipos celulares no deseados puede realizarse solo con mezcla mecánica y adición de baja concentración de enzima (p. ej., colagenasa, tripsina); se consigue una suspensión de células sencilla con eliminación mediante lavado fácil de los tipos de células no deseados.

[0089] En una realización, el destino de los tipos celulares y la formación de agregados celulares y tejido así como el estado fisiológico y/o el desarrollo de las células o agregados celulares se analizan, por ejemplo, mediante medidas de tensión isométrica, ecocardiografía y similares. Preferiblemente, el estado de las células o agregados celulares se analiza mediante el seguimiento de la diferenciación de la actividad eléctrica de las células en una matriz, por ejemplo, registrando los potenciales de campo extracelulares con una matriz de microelectrodos (MEA). Por ejemplo, las propiedades electrofisiológicas durante el proceso de diferenciación en curso de células madre embrionarias que se diferencian en miocitos cardíacos pueden seguirse mediante los registros de potenciales de campo extracelulares con matrices de microelectrodos (MEA) que constan de, por ejemplo, 60 electrodos integrados en el sustrato; véase Banach y col. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284 (2003), H2114-H2123. Se usaron matrices múltiples de microelectrodos de tungsteno para registrar las respuestas concurrentes de neuronas madre cerebrales que contribuyen a la generación de patrones motores respiratorios; véase Morris y col., *Respir. Physiol.* 121 (2000), 119-133.

[0090] La presente invención también se refiere a células, agregados celulares y tejido que se obtienen mediante los procedimientos descritos anteriormente, en los que dichas células son capaces de diferenciarse en al menos dos tipos celulares. Por tanto, dichas células son preferiblemente células específicas de tejido y tipo celular embrionarios, más preferiblemente tejido cardíaco. Así mismo, los órganos, agregados celulares y tejido constituidos a partir de dichas células son sujeto de la presente invención así los implantes o trasplantes que contienen dichas células, agregados celulares, tejido u órganos. Todos ellos pueden usarse en un procedimiento de tratamiento de tejido u órganos dañados en un sujeto, lo que comprende su implantación o trasplante en el sujeto que lo necesite. Por tanto, las composiciones como composiciones farmacéuticas que comprenden cualquier de estas moléculas de ácido nucleico recombinante, células, agregados celulares o tejido de la presente invención como se describe en este documento están incluidos en el alcance de la presente invención. Como se describió anteriormente, estas composiciones y procedimientos de la invención pueden usarse para diversos objetivos, por ejemplo, para analizar las etapas iniciales de la formación tisular durante el desarrollo embrionario o la influencia de factores y compuestos sobre este proceso.

[0091] Aún en una realización adicional, la presente invención se refiere a animales transgénicos no humanos que pueden generarse a partir de las células ES mencionadas y de los tipos celulares y agregados celulares derivados de células ES; véase *supra*. La generación de animales transgénicos a partir de células ES es conocida en la técnica; véase por ejemplo, A. L. Joyner Ed., *Gene Targeting, A Practical Approach* (1993), Oxford University Press. En la materia se describe un procedimiento general para obtener animales transgénicos no humanos, véase por ejemplo, la solicitud internacional WO94/24274.

[0092] En un aspecto especialmente preferido, la presente invención se refiere a un procedimiento para mejorar la función cardíaca en un mamífero tras un infarto de miocardio, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

(a) transfectar células madre embrionarias (ES) de mamífero con una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un gen de resistencia bajo el control de secuencias reguladores específicos cardíacas, de fibroblastos y, opcionalmente, de endotelio y que, opcionalmente, comprende uno o más indicadores en las mismas secuencias reguladoras;

(b) cultivar dichas células ES *in vitro* en un medio de cultivo que contiene el agente selectivo para el gen de resistencia en condiciones que permiten la diferenciación de dichas células ES en cardiomiocitos, fibroblastos y, opcionalmente, células endoteliales;

(c) eliminar a partir de dichos cardiomiocitos, fibroblastos y, opcionalmente, células endoteliales diferenciadas células no diferenciadas, opcionalmente junto con células diferenciadas hacia tipos celulares irrelevantes; opcionalmente

(d) permitir la integración y el alineamiento de dichos cardiomiocitos, fibroblastos y, opcionalmente, células endoteliales en diferenciación en el tejido similar a cardíaco;

(e) cotrasplantar posteriormente dichos cardiomiocitos, fibroblastos y, opcionalmente, células endoteliales o dicho tejido en al menos una porción de la zona previamente infartada del tejido cardíaco; y

(f) permitir que dichas células o tejido introducidos se implanten *in situ* como células viables situadas dentro del área previamente infartada del tejido cardíaco, en el que el implante tiene como resultado una mejora de la función cardíaca en dicho mamífero siempre que las células no deriven de un embrión humano.

Como se mencionó anteriormente, dichos cardiomiocitos, fibroblastos y, opcionalmente, células endoteliales derivan preferiblemente de la misma célula ES. No obstante, también pueden usarse cardiomiocitos, fibroblastos y, opcionalmente, células endoteliales derivadas de diferentes células ES. En esas realizaciones, dicha secuencia reguladora específica cardíaca se selecciona preferiblemente entre los promotores α MHC, MLC2v, MLC1a, MLC2a y β MHC, dicha secuencia reguladora específica de endotelio se selecciona preferiblemente entre los promotores de Tie2, Tie1 y cadherina, y dicha secuencia reguladora específica de fibroblastos se selecciona preferiblemente entre los promotores del colágeno I; véase *supra*. De forma similar, dicho indicador para dichos cardiomiocitos, fibroblastos y, opcionalmente, células endoteliales se seleccionan preferiblemente de forma independiente a partir de las proteínas verdes fluorescentes potenciadas ECFP (azul), EYFP (amarilla), y hcrFP (roja); véase también la figura 3 y los ejemplos. Dicho gen de resistencia y dicho indicador están, preferiblemente, separados por un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES).

[0093] En otros ejemplos, se generan células neuroepiteliales que se usan para aumentar o sustituir células dañadas por enfermedad, trastornos autoinmunes, daño accidental o trastorno genético. Puede inducirse a células ES de ratón a diferenciarse *in vitro* con ácido retinoico para formar precursores neuronales y gliales, positivos para marcadores de astrocitos (GFAP) u oligodendrocitos (O4) y, después, estos últimos en neuronas funcionales (Fraichard y col., *J. Cell Science* 108 (1995), 3161-3188). Se observó que las células trasplantadas en cerebros adultos invadían el núcleo estriado del huésped (Deacon y col., *Exp. Neurology*, 149 (1998), 28-41). Las líneas celulares EC humanas y de ratón también pueden diferenciarse en neuronas. (Trojanowski y col., *Exp. Neurology*, 144 (1997), 92-97; Wojcik y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (1993), 1305-1309). El trasplante de estas neuronas en ratas sometidas a isquemia cerebral promovía un grado de recuperación funcional (Borlongan y col., *Exp. Neurology* 149 (1998), 310-321). Según la presente invención, para esta realización se usan los correspondientes promotores específicos de neuronas y glía; véase, por ejemplo, Kawai y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1625 (2003), 246-252 y Kugler y col., *Gene Ther.* 10 (2003), 337-347, para los promotores específicos de glía y neuronales. La eficacia de la formación de cuerpos embrioides y el desarrollo hematopoyético a partir de células madre

embrionarias en diferentes sistemas de cultivo se describen, por ejemplo, en Dang y col., *Biotechnol. Bioeng.* 78 (2002), 442-453. En otro uso de la invención, las células ES o sus derivados en diferenciación o diferenciados pueden usarse para la generación de estructuras no celulares como sustituciones de hueso o cartílago. En otro uso de la invención, las células ES o sus derivados en diferenciación o diferenciados pueden usarse para la generación de tejido hepático. Las secuencias reguladoras para la expresión específica de tipo celular pueden obtenerse a partir de la literatura y fuentes comunes como "medline" y NCBI. Si se desea, estas células pueden estar genéticamente modificadas a fines de terapia génica.

[0094] En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un vector o una composición de vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico recombinantes según se define en el contexto de los procedimientos de la presente invención anteriormente en este documento. En particular, la presente invención se refiere a vectores y composiciones de vectores que comprenden en suma al menos dos unidades de un gen de resistencia bajo el control de una secuencia reguladora específica cardíaca, de fibroblastos y, opcionalmente, endotelio, y que, opcionalmente comprenden uno o más indicadores bajo las mismas secuencias reguladoras específicas como se describe anteriormente; véase también la figura 3A. Estos vectores o composiciones de vector pueden estar sustancialmente aislados o pueden estar presentes en una muestra o, por ejemplo, en una o más células huésped útiles para, por ejemplo, la propagación de los vectores.

[0095] En una realización especialmente preferida, la presente invención se refiere a matrices que comprenden un soporte sólido y unido a este o suspendido en él células, agregados celulares o tejido obtenidos por el procedimiento de la presente invención o en el proceso de diferenciación. Es de especial interés el uso de matrices planas de microelectrodos para el cultivo de células y agregados celulares como biosensores. Estas matrices generalmente constan de un sustrato de vidrio, plástico o silicón sobre el que se deposita un conductor, por ejemplo, oro, platino, óxido de indio y estaño, iridio, etc. Se deposita una capa aislante, por ejemplo, poliimida, dióxido de silicio, nitruro de silicio, etc., fotoresistente, sobre los electrodos conductores y se conectan entre sí, y, a continuación, se eliminan las regiones entre los electrodos para definir los puntos de registro. Las células se cultivan directamente sobre esta superficie y se pone en contacto el conducto expuesto en los puntos de registro no aislados. Dependiendo del tamaño de los electrodos y de las células, los registros de la actividad eléctrica pueden proceder de una única célula o de poblaciones de células que incluyan agregados celulares. Cada punto de electrodo generalmente está conectado a la entrada de una alta impedancia de entrada, un amplificador de bajo ruido, con o sin condensadores de acoplamiento de CA, que permiten la amplificación de las señales extracelulares relativamente pequeñas. Ejemplos de dichos biosensores se describen en Novak y col., *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* BME-33(2) (1986), 196-202; Drodge y col., *J. Neuroscience Methods* 6 (1986), 1583-1592; Eggers y col., *Vac. Sci. Technol.* B8(6) (1990), 1392-1398; Martinoia y col., *J. Neuroscience Methods* 48 (1993), 115-121; Maeda y col., *J. Neuroscience* 15 (1995), 6834-6845 y Mohr y col., *Sensors and Actuators B-Chemical* 34 (1996), 265-269. También es materia de la presente invención un aparato preparado y adaptado para el análisis de las matrices descritas anteriormente.

[0096] Las células, agregados celulares, tejido, órgano y procedimientos de la presente invención son especialmente adecuados para su uso en la selección de fármacos y en aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, las células madre diferenciadas de este invención pueden usarse para la selección de factores (como solventes, moléculas pequeñas, fármacos, péptidos, polinucleótidos y similares) o condiciones ambientales (como condiciones de cultivo o manipulación) que afectan a las características de las células en diferenciación. Las aplicaciones de selección en particular de esta invención se refieren a la prueba de compuestos farmacéuticos en la investigación de fármacos. Estas se refieren generalmente al libro de texto convencional "In vitro Methods in Pharmaceutical Research", Academic Press, 1997 y la patente de EE. UU. 5 030 015. La evaluación de la actividad de los compuestos farmacéuticos candidatos generalmente implica la combinación de células diferenciadas de esta invención con el compuesto candidato, determinando cualquier cambio en la morfología, fenotipo marcador o actividad metabólica de las células que es atribuible al compuesto (en comparación con células no tratadas o células tratadas con un compuesto inerte) y, a continuación, correlacionar el efecto del compuesto con el cambio observado. La selección puede realizarse, por ejemplo, porque el compuesto se diseña para tener un efecto farmacológico sobre determinados tipos celulares o porque un compuesto diseñado para tener efectos en otra parte puede tener efectos adversos no deseados. Pueden probarse dos o más fármacos en combinación (mediante su combinación con las células de forma simultánea o secuencial) para detectar posibles efectos de interacción farmacológica. En algunas aplicaciones, los compuestos se seleccionan inicialmente según su posible toxicidad (Castell y col., pág. 375-410 en "In vitro Methods in Pharmaceutical Research," Academic Press, 1997). La citotoxicidad puede determinarse en el primer caso mediante el efecto sobre la viabilidad celular, supervivencia, morfología y expresión o liberación de determinados marcadores, receptores o enzimas. Los efectos de un fármaco sobre el ADN cromosómico pueden determinarse midiendo la síntesis o reparación del ADN. La incorporación de

[H]timidina o BrdU, especialmente en momentos no programados en el ciclo celular, o por encima del nivel requerido para la replicación celular, coincide con un efecto del fármaco. Los efectos no deseados también pueden incluir tasas inusuales de intercambio de cromátidas hermanas, determinado mediante una extensión en metafase. Consulte A. Vickers (pág. 374-410 en "In vitro Methods in Pharmaceutical Research, "Academic Press, 1997) para su elaboración adicional.

[0097] Por tanto, en una realización adicional la presente invención se refiere a procedimientos para obtener y/o realizar el perfil de una sustancia de ensayo capaz de influir sobre el desarrollo celular y/o sobre la formación de la estructura tisular cardíaca que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra de ensayo que comprende una célula, un agregado celular, un tejido o un órgano preparado o diferenciado según la presente invención con una sustancia de ensayo; y

(b) determinar una respuesta fenotípica en dicha muestra de ensayo en comparación con una muestra control, en la que un cambio en la respuesta fenotípica de dicha muestra de ensayo en comparación con la muestra control es una indicación de que dicha sustancia de ensayo tiene un efecto sobre el desarrollo celular y/o la formación de la estructura tisular.

[0098] Estos procedimientos pueden sustituir a diversos modelos animales y formar nuevas pruebas basadas en humanos y biosensores ambientales extremos. En especial, los procedimientos de la invención pueden usarse para pruebas toxicológicas, mutagénicas y/o teratogénicas *in vitro*. Puesto que las células y tejido obtenidos según la presente invención recuerda más de cerca a la situación *in vivo*, se prevé que los resultados obtenidos mediante los ensayos toxicológicos de la presente invención se correlacionen también con la teratogenicidad *in vivo* de los compuestos probados.

[0099] Por ejemplo, los compuestos, en particular compuestos activos cardíacos pueden probarse según los procedimientos descritos en el documento DE 195 25 285 A1; Seiler y col., ALTEX 19 Supl. 1 (2002), 55-63; Takahashi y col., Circulation 107 (2003), 1912-1916 y Schmidt y col., Int. J. Dev. Biol. 45 (2001), 421-429; en este último se describe una prueba para células ES (EST) utilizada en un estudio de valoración de la Unión Europea para la selección de agentes embriotóxicos determinando la diferenciación dependiente de concentración de células ES en células cardíacas y miogénicas.

[0100] Las células y tejido del sistema nervioso central (SNC) generados por los procedimientos de la presente invención o durante la diferenciación en dichos procedimientos pueden probarse, por ejemplo, en cultivos celulares como se describe en la patente de EE. UU. 6 498 018. De forma similar, pueden probarse células y tejido relacionados con el hígado; véase, por ejemplo, la solicitud de EE. UU. US2003/0003573. Un procedimiento de ensayo *in vitro* adicional para la detección de efectos inducidos químicamente sobre el desarrollo embrionario y la diferenciación para el objetivo de selección de embriotoxicidad/teratogenicidad basado en células madre embrionarias (ES) pluripotentes diferenciadas de ratones y ratas usando células germinales embrionarias (EG) obtenidas a partir de células germinales primordiales se describe en la solicitud internacional WO97/01644 y puede adaptarse según las indicaciones de la presente invención.

[0101] Las formulaciones para la comprobación de compuestos preferidos no incluyen componentes adicionales como conservantes, que tengan un efecto significativo sobre la formulación global. Por tanto, las formulaciones preferidas constan esencialmente de un compuesto activo biológico y un vehículo fisiológicamente aceptable, por ejemplo, agua, etanol, DMSO, etc. No obstante, si un compuesto es líquido sin un excipiente, la formulación puede constar esencialmente del compuesto en sí. Adicionalmente, pueden realizarse una diversidad de ensayos en paralelo con diferentes concentraciones del compuesto para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Como se conoce en la técnica, la determinación de la concentración eficaz de un compuesto típicamente usa un intervalo de concentraciones resultantes de diluciones 1:10, o a otra escala logarítmica. Las concentraciones pueden, si es necesario, refinarse además con una segunda serie de diluciones. Típicamente, una de estas concentraciones sirve como control negativo, es decir, a concentración cero o por debajo del nivel de detección.

[0102] Los compuestos de interés abarcan numerosas clases químicas, aunque típicamente son moléculas orgánicas. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteína, especialmente enlaces de hidrógeno, y típicamente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos a menudo comprenden estructuras de carbono cíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas

con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Entre los agentes candidatos también se encuentran biomoléculas incluidos péptidos, ácidos nucleicos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

5 **[0103]** Se obtienen compuestos y agentes candidatos a partir de una amplia variedad de fuentes incluidas bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, hay disponibles numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluida la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Alternativamente, hay disponibles o se obtienen bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos de bacterias, fúngicos, vegetales y animales. Por ejemplo, la inhibición
10 de la angiogénesis inducida por tumor y la expresión de la metaloproteínasa de matriz en cultivos de confrontación de cuerpos embrioides y esferoides tumorales mediante principios vegetales utilizados en medicina china tradicional se ha descrito en Wartenberg y col., Lab. Invest. 83 (2003), 87-98.

[0104] Adicionalmente, las bibliotecas y los compuestos naturales u obtenidos mediante síntesis se modifican
15 fácilmente por medios químicos, físicos o bioquímicos convencionales y pueden usarse para producir bibliotecas combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas directas o aleatorias, como acilación, alquilación, esterificación, amidación, etc., para producir análogos estructurales.

[0105] Los compuestos también pueden estar incluidos en una muestra que incluya líquidos a los que se han
20 añadido componentes adicionales, por ejemplo, componentes que afectan a la fuerza iónica, pH, concentración de proteína total, etc. Además, las muestras pueden tratarse para conseguir al menos un fraccionamiento o concentración parcial. Las muestras biológicas pueden almacenarse si se hace con precaución para reducir la degradación del compuesto, por ejemplo, en atmósfera de nitrógeno, congeladas o con una combinación de ambos. El volumen de la muestra utilizado es suficiente para permitir una detección mensurable, normalmente es suficiente
25 de aproximadamente 0,1 µl a 1 ml de una muestra biológica.

[0106] Entre los compuestos de ensayo se incluyen todas las clases de moléculas descritas anteriormente, y pueden comprender además muestras de contenido desconocido. Aunque muchas muestras contendrán compuestos en solución, también pueden ensayarse muestras sólidas que pueden disolverse en un solvente
30 adecuado. Entre las muestras de interés se incluyen muestras ambientales, por ejemplo, aguas subterráneas, aguas marinas, residuos de minería, etc.; muestras biológicas, por ejemplo, lisados preparados a partir de cultivos, muestras de tejidos, etc.; muestras de producción, por ejemplo, curso temporal durante la preparación de compuestos farmacéuticos; así como bibliotecas de compuestos preparados para análisis y similares. Se ha evaluado el posible valor terapéutico de muestras de compuestos de interés, es decir, de candidatos a fármacos.
35

[0107] El compuesto de ensayo puede opcionalmente ser una biblioteca combinatoria para la selección de muchos compuestos. Dicha colección de sustancias de ensayo puede tener una diversidad de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^5 y se reduce normalmente con éxito aplicando el procedimiento, opcionalmente combinado con otros dos o más veces. Los compuestos identificados en el procedimiento de la invención pueden
40 ser adicionalmente evaluados, detectados, clonados, secuenciados y similares, en solución o tras su unión a un soporte sólido, mediante cualquier procedimiento normalmente aplicado a la detección de una secuencia de ADN específica como PCR, restricción de oligómero (Saiki y col., Bio/Technology 3 (1985), 1008-1012), análisis de sondas oligonucleotídicas específicas de alelo (ASO) (Conner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983), 278), ensayos de ligamiento de oligonucleótidos (OLA) (Landegren y col., Science 241 (1988), 1077) y similares. Se han
45 revisado las técnicas moleculares para el análisis de ADN (Landegren y col., Science 242 (1988), 229-237). Por tanto, el procedimiento de la presente invención puede también utilizarse para obtener el perfil transcripcional de células madre embrionarias y adultas; véase, por ejemplo, Ramalho-Santos y col., Science 298 (2002), 597-600; Tanaka y col., Genome Res. 12 (2002), 1921-1928.

50 **[0108]** La incubación incluye condiciones que permiten el contacto entre el compuesto de ensayo y las células ES o células derivadas de ES. El contacto puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, puede ser deseable probar una matriz de compuestos o pequeñas moléculas sobre una única o algunas células ES en un "chip" u otro soporte sólido; véase *supra*. Por ejemplo, los cardiomiocitos o las neuronas de los chips podrían proporcionar una lectura de la velocidad de contracción o del número de descargas (disparos),
55 respectivamente, en respuesta a un compuesto y servir para la detección de agentes ambientales dañinos o, al menos, biológicamente activos.

Las matrices de electrodos neuronales biológicamente compatibles permiten que las células madre se sometan a diferenciación adicional en la propia matriz. Estas matrices permiten la medida en tiempo real de los cambios en la

actividad eléctrica en las neuronas derivadas de células ES en respuesta a la presencia de agentes conocidos o no identificados. La actividad eléctrica de los cardiomiocitos puede controlarse mediante la disposición sobre placas de las células en una matriz de microelectrodos extracelulares (Connolly y col., Biosens. Biores. 5 (1990), 223-234). Las células muestran contracciones regulares y las señales extracelulares registradas muestran una relación con los registros de voltaje intracelular (Connolly y col., *supra*). Este procedimiento no invasivo permite el seguimiento a largo plazo y es más simple y sólido que las técnicas de pinzamiento zonal en célula completa.

[0109] Por tanto, en un procedimiento preferido de la presente invención, la respuesta fenotípica que se va a determinar comprende propiedades electrofisiológicas, preferiblemente determinado durante el proceso de diferenciación en curso. Esta realización es especialmente adecuada para proporcionar patrones de referencia de modulación y bases de datos para los patrones de referencia de modulación para una amplia gama de compuestos biológicamente activos. A continuación, los patrones de referencia se utilizan para la identificación y clasificación de los compuestos de ensayo. La evaluación de los compuestos de ensayo puede usarse para conseguir resultados diferentes.

Los expertos en la materia conocen los procedimientos para la clasificación de agentes biológicos según la firma de densidad espectral de cambios evocados en el potencial eléctrico celular; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. 6 377 057. Por tanto, los compuestos biológicamente activos se clasifican según su efecto sobre los canales iónicos, cambios en el potencial de membrana y en las corrientes iónicas, y el contenido de frecuencia de potenciales de acción que los compuestos evocan en las células excitables. Los cambios de densidad espectral de dicho potencial de membrana evocado o potencial de acción son una característica de cada tipo de canal que es modulada por los compuestos de ensayo. Un patrón de cambios espectrales en el potencial de membrana se determina poniendo en contacto una célula sensible con un compuesto y haciendo un seguimiento del potencial de membrana o las corrientes iónicas durante el tiempo. Estos cambios se correlacionan con el efecto de ese compuesto, o clase de compuestos, sobre los canales iónicos de la célula respondedora. Este patrón de cambios espectrales proporciona una firma única para el compuesto y proporciona un procedimiento útil para la caracterización de los agentes que modulan el canal. El efecto de un compuesto sobre los canales iónicos y sobre el potencial de acción de una célula viva, puede proporcionar información útil sobre la clasificación e identidad del compuesto. Los procedimientos y medios para extraer dicha información son de especial interés para el análisis de compuestos biológicamente activos, con aplicaciones específicas en la selección farmacológica, descubrimiento de fármacos, monitorización ambiental, detección y clasificación de guerra biológica y similares. Se describen ejemplos de biosensores basados en células completas en Gross y col., Biosensors and Bioelectronics 10 (1995), 553-567; Hickman y col. Abstracts of Papers American Chemical Society 207 (1994), BTEC 76 e Israel y col., American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology 27 (1990), H1906-H1917.

Connolly y col., Biosens. Biores. 5 (1990), 223-234, describen una matriz plana de microelectrodos desarrollada para hacer un seguimiento la actividad eléctrica de células en cultivo. El dispositivo permite la incorporación de características de topografía superficial en una capa aislante sobre los electrodos. Se emplea la tecnología de semiconductores para la fabricación de electrodos de oro y para el depósito y modelado de una capa aislante de nitruro de silicio³³. Los electrodos se probaron usando un cultivo de células cardíacas de miocitos de embrión de pollo, y los latidos físicos de las células cultivadas se correlacionaban con las medidas del voltaje extracelular obtenidas. El control molecular de los canales iónicos cardíacos se revisa en Clapham, Heart Vessels Supl. 12 (1997), 168-169. Oberg y Samuelsson, J. Electrocardiol. 14 (1981), 13942, realizaron análisis de Fourier sobre las fases de repolarización de potenciales de acción cardíacos. Rasmussen y col., American Journal of Physiology 259 (1990), H370-H389, describen un modelo matemático de actividad electrofisiológica en aurículas de sapo toro.

[0110] Existe una gran cantidad de literatura sobre el área general de canales iónicos. Puede encontrarse una revisión de la literatura en las series de libros, "The Ion Channel Factsbook", volúmenes 1-4, de Edward C. Conley y William J. Brammar, Academic Press. Se proporciona una visión general de: canales iónicos dependientes de ligando extracelulares (ISBN: 0121844501), canales dependientes de ligando intracelulares (ISBN: 012184451X), canales rectificadores internos e intercelulares (ISBN: 0121844528) y canales dependientes de voltaje (ISBN: 0121844536). Hille, B. (1992) "Ionic Channels of Excitable Membranes", 2ª Ed. Sunderland MA: Sinauer Associates.

[0111] En otro aspecto, las células cultivadas o modificadas usando los materiales y procedimientos proporcionados por la presente invención se colocan sobre las superficies de soporte para realizar la selección de sustancias bioactivas. En un ejemplo, las células se conjugaron con un sustrato de modo que pueden medirse los cambios electrofisiológicos en las células en respuesta a estímulos externos, por ejemplo, para su uso como una selección de alto rendimiento para sustancias bioactivas. Las células también pueden transfectarse con ADN que se dirige, expresa o silencia genes específicos o productos génicos en la célula. Proporcionando dichas células sobre

un chip conjugadas con dispositivos de medida, como un ordenador, puede analizarse de forma rápida y precisa muchos compuestos. Las células o chips podrían también estar conjugados a los dispositivos de medición en matrices para una selección paralela a mayor escala.

5 **[0112]** Los procedimientos de ensayo de la presente invención pueden estar en formato analítico convencional o adaptado para un alto rendimiento. El término "alto rendimiento" (HTS) se refiere a un ensayo diseñado que permite un análisis fácil de múltiples muestras de forma simultánea y permite la manipulación robótica. Otra característica deseada de los ensayos de alto rendimiento es un diseño del ensayo que se optimiza para reducir el uso de reactivos o minimizar el número de manipulaciones para conseguir el análisis deseado. Entre los
10 ejemplos de formatos de ensayo se incluyen placas de 96 pocillos, 384 pocillos o más pocillos, gotas colgantes y chips de microcanales en "laboratorios en un chip" utilizados para experimentos de manipulación de líquidos. Es bien conocido por los expertos en la materia que con el avance de la miniaturización de los moldes de plástico y de los dispositivos de manejo de líquidos, o con la mejora del diseño de los dispositivos de ensayo, pueden analizarse un número mucho mayor de muestras usando el diseño de la presente invención.

15 **[0113]** En el procedimiento de la invención, dichas células están contenidas preferiblemente en un recipiente, por ejemplo, en un pocillo de una placa de microvaloración, que puede ser una placa de 24, 96, 384 y 1586 pocillos. Alternativamente, las células pueden introducirse en dispositivos microfluídicos, como los proporcionados por Caliper (Newton, MA, EE. UU.). En otra realización preferida, el procedimiento de la presente invención comprende obtener
20 los procedimientos de selección de la presente invención se añade a la muestra o medio de cultivo un compuesto conocido por activar o inhibir el proceso de diferenciación y/o formación de la estructura tisular, por ejemplo, ácido retinoico; véanse también *supra* los compuestos apropiados.

25 **[0114]** Adicionalmente, los procedimientos descritos anteriormente pueden, por supuesto, combinarse con una o más etapas de cualquiera de los procedimientos de selección descritos anteriormente u otros procedimientos de selección bien conocidos en la técnica. Los procedimientos para el descubrimiento de compuestos clínicos comprenden por ejemplo, la selección de ultra alto rendimiento (Sundberg, Curr. Opin. Biotechnol. 11 (2000), 47-53) para la identificación de prototipos, y el diseño de fármacos basado en la estructura (Verlinde y Hol, Structure 2
30 (1994), 577-587) y la química combinatoria (Salemme y col., Structure 15 (1997) 319-324) para la optimización de prototipos. Una vez seleccionado un fármaco, el procedimiento puede tener una etapa adicional de repetición del procedimiento utilizado para realizar un diseño racional del fármaco usando el fármaco modificado y evaluar si dicho fármaco modificado muestra una mejor afinidad según, por ejemplo, el análisis de interacción/energía. El procedimiento de la presente invención puede repetirse una o más veces de modo que se reduzca sucesivamente la
35 diversidad de dicho compendio de compuestos.

[0115] Las sustancias se metabolizan tras su administración *in vivo* para su eliminación mediante excreción o metabolización en uno o más metabolitos activos o inactivos (Meyer, J. Pharmacokinetic. Biopharm. 24 (1996), 449-459). Por tanto, en lugar de usar el compuesto o fármaco real identificado y obtenido según los procedimientos de la
40 presente invención, puede usarse una formulación correspondiente como profármaco que se convierte en su forma activa en el paciente mediante su metabolismo. Las medidas de precaución que pueden tomarse para la aplicación de profármaco y fármacos se describen en la literatura; véase, para revisión, Ozama, J. Toxicol. Sci. 21 (1996), 323-329.

45 **[0116]** Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso de un compuesto identificado, aislado y/o producido por cualquiera de estos procedimientos para la preparación de una composición para el tratamiento de trastornos relacionados con, por ejemplo, el daño tisular o la formación de tejidos u órganos aberrantes, insuficiencia cardíaca, etc.; véase también *supra*. Preferiblemente, el compuesto aislado o el fármaco correspondiente ayuda en la curación de la herida y/o en la curación del tejido dañado. Como procedimiento para el tratamiento puede
50 administrarse al sujeto que sufre de dicho trastorno la sustancia identificada o la composición que la contiene. También pueden utilizarse compuestos identificados, aislados y/o producidos mediante el procedimiento descrito anteriormente como compuestos prototipo en el descubrimiento de fármacos y la preparación de fármacos o profármacos. Esto normalmente implica la modificación del compuesto prototipo, un derivado del mismo o un compuesto aislado como se describe anteriormente en este documento modificando de este modo dicha sustancia
55 para alterar, eliminar y/o derivar una porción de la misma que se sospecha causa toxicidad o aumento de la biodisponibilidad, solubilidad y/o semivida. El procedimiento puede además comprender la mezcla de la sustancia aislada o modificada con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las distintas etapas mencionadas anteriormente generalmente son conocidas en la técnica. Por ejemplo, hay disponibles programas de ordenador para la implementación de estas técnicas; por ejemplo, Rein, Computer-Assisted Modeling of Receptor-Ligand Interactions

(Alan Liss, Nueva York, 1989). Los procedimientos para la preparación de derivados y análogos químicos son bien conocidos por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Beilstein, Handbook of Organic Chemistry, Springer Edition New York Inc., 175 Fifth Avenue, Nueva York, N.Y. 10010 U.S.A., y Organic Synthesis, Wiley, Nueva York, EE. UU. Adicionalmente, pueden usarse peptidomiméticos y/o diseños asistidos por ordenados de 5 derivados y análogos apropiados, por ejemplo, según los procedimientos descritos anteriormente. Los procedimientos para la generación de prototipos en el descubrimiento de fármacos también incluyen el uso de proteínas y procedimientos de detección como la espectrometría de masas (Cheng y col., J. Am. Chem. Soc. 117 (1995), 8859-8860) y algunos procedimientos de resonancia magnética nuclear (RMN) (Fejzo y col., Chem. Biol. 6 (1999), 755-769; Lin y col., J. Org. Chem. 62 (1997), 8930-8931). También pueden incluir o depender de análisis de 10 relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) (Kubinyi, J. Med. Chem. 41 (1993), 2553-2564, Kubinyi, Pharm. Unserer Zeit 23 (1994), 281-290), bioquímica combinatoria, química clásica y otros (véase, por ejemplo, Holzgrabe y Bechtold, Pharm. Acta Helv. 74 (2000), 149-155). Adicionalmente, pueden encontrarse ejemplos de vehículos y procedimientos de formulación en Remington's Pharmaceutical Sciences.

15 **[0117]** Una vez seleccionado el fármaco según uno cualquiera de los procedimientos de la presente invención descritos anteriormente, el fármaco o un profármaco del mismo puede sintetizarse en una cantidad terapéuticamente eficaz. Según se usa en este documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la 20 cantidad total del fármaco o profármaco que es suficiente para que el paciente muestre un beneficio significativo, es decir, tratamiento, curación, prevención o mejora del tejido dañado, o un aumento de la tasa de tratamiento, curación, prevención o mejora de dichas afecciones. Además o alternativamente, en especial con respecto a la prueba preclínica del fármaco, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" incluye la cantidad total del fármaco o profármaco que es suficiente para obtener una respuesta fisiológica en una prueba en animales no humanos.

[0118] La presente invención también se refiere a composiciones de kit que contienen reactivos específicos 25 como los descritos anteriormente en este documento útiles para realizar cualquiera de los procedimientos de la presente invención descritos anteriormente, que contienen el vector o la composición de vectores descritos anteriormente en este documento, células pluripotentes, siempre que las células no deriven de un embrión humano y, opcionalmente, un medio de cultivo, moléculas de ácido nucleico recombinantes, compuestos patrón, etc.. Dicho kit podría típicamente comprender un vehículo compartimentalizado adecuado para mantenerse el confinamiento al 30 menos en un recipiente. El vehículo podría además comprender reactivos útiles para llevar a cabo dichos procedimientos. El vehículo también puede contener un medio para la detección, tal como sustratos enzimáticos marcados o similares.

[0119] Por tanto, los medios y procedimientos de la presente invención descritos anteriormente en este 35 documento pueden usarse en diversas aplicaciones incluidas, pero sin limitaciones, los ensayos de "pérdida de función", con células ES que contienen mutaciones homocigotas de genes específicos, ensayos de "ganancia de función" con células ES que sobreexpresan genes exógenos, análisis de desarrollo de compuestos teratógenos/embriotóxicos *in vitro*, ensayos farmacológicos y el establecimiento de sistemas modelo para funciones de células patológicas, y la aplicación de factores de diferenciación y crecimiento para la inducción de células 40 diferencias de forma selectiva que pueden usarse como fuente para implantes de tejido; véase para revisión, por ejemplo, Guan y col., Altex 16 (1999), 135-141.

[0120] Estas y otras realizaciones están descritas y las abarcan la descripción y los ejemplos de la presente invención. Bibliografía adicional correspondiente a cualquiera de los materiales, procedimientos, usos y compuestos 45 que han de emplearse según la presente invención pueden obtenerse de bibliotecas y bases de datos públicas, usando por ejemplo, dispositivos electrónicos. Por ejemplo, puede utilizarse la base de datos pública «medline» que está hospedada por el National Center for Biotechnology Information y/o la National Library of Medicine de los National Institutes of Health. Otras bases de datos y direcciones web, como las del European Bioinformatics Institute (EBI), que es parte del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) son conocidas por los expertos en la materia 50 y también pueden obtenerse usando motores de búsqueda en Internet. En Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364, se proporciona una visión general de la información de patentes en biotecnología y un estudio de las fuentes relevantes de información de patentes útil para la búsqueda retrospectiva y el conocimiento presente.

[0121] La descripción anterior describe en general la presente invención. Puede obtenerse un entendimiento 55 más completo en referencia a los siguientes ejemplos y figuras específicas que se proporcionan en este documento solo con fines ilustrativos.

[0122] En la práctica de la presente invención se emplearán, a menos que se indique lo contrario, las técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, microbiología, ADN recombinante,

química de proteínas e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica.

[0123] Por una elaboración adicional de las técnicas generales relacionadas con la tecnología de células madre, el profesional puede referirse a libros de texto y revisiones convencionales, por ejemplo Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach (E. J. Robertson, ed., IRL Press Ltd. 1987); Guide to Techniques in Mouse Development (P. M. Wasserman y col., eds., Academic Press 1993); Embryonic Stem Cell Differentiation in Vitro (Wiles, Meth. Enzymol. 225 (1993), 900,); Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy (Rathjen y col., Reprod. Fertil. Dev. 10 (1998), 31,). La diferenciación de células madre se revisa en Robertson, Meth. Cell Biol. 75 (1997), 173 y Pedersen, Reprod. Fertil. Dev. 10 (1998), 31. Además de las fuentes de células madre ya descritas anteriormente se proporcionan referencias adicionales; véanse Evans y Kaufman, Nature 292 (1981), 154-156; Handyside y col., Roux's Arch. Dev. Biol., 196 (1987), 185-190; Flechon y col., J. Reprod. Fertil. Abstract Series 6 (1990), 25; Doetschman y col., Dev. Biol. 127 (1988), 224-227; Evans y col., Theriogenology 33 (1990), 125-128; Notarianni y col., J. Reprod. Fertil. Suppl., 43 (1991), 255-260; Giles y col., Biol. Reprod. 44 (Supl. 1) (1991), 57; Strelchenko y col., Theriogenology 35 (1991), 274; Sukoyan y col., Mol. Reprod. Dev. 93 (1992), 418-431; Iannaccone y col., Dev. Biol. 163 (1994), 288-292.

[0124] Los procedimientos de genética molecular e ingeniería genética se describen generalmente en las ediciones actuales de Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Sambrook y col., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press); DNA Cloning, volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. B. Hames & Higgins eds. (1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan, R. Liss, Inc., 1987); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller & Calos, eds.); Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3ª Edición (F. M. Ausubel y col., eds.) y Recombinant DNA Methodology (R. Wu, ed., Academic Press). Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller y M.P. Calos, eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vol. 154 y 155 (Wu y col., eds.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); el tratado, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (D. M. Weir y C.C. Blackwell, eds., 1986). Los reactivos, vectores de clonación y kits para manipulación genética referidos en esta descripción están disponibles a partir de proveedores comerciales como BioRad, Stratagene, Invitrogen y ClonTech. Las técnicas generales de cultivo celular y recogida de medios se describen en Large Scale Mammalian Cell Culture (Hu y col., Curr. Opin. Biotechnol. 8 (1997), 148); Serum-free Media (Kitano, Biotechnology 17 (1991), 73); Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991), 375) y Suspension Culture of Mammalian Cells (Birch y col., Bioprocess Technol. 19 (1990), 251).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación de los clones de células ES transgénicas para la selección de fármacos de los cardiomiocitos derivados de células ES

Diseño del vector

[0125] El fragmento BamHI-Sall de 5,5 kb de la región promotora para la cadena pesada de α -miosina específica de tejido cardíaco (α MHC) (N.º de acceso a GenBank: U71441; Subramaniam y col., J. Biol. Chem. 266 (1991), 24613-24620; Sanbe y col., Circ. Res. 92 (2003), 609-616) y se codifica la región codificadora para el casete de resistencia a puomicina (Pac), se insertó posteriormente en el sitio de multiclonación (MCS) del vector pIRES2-EGFP (Clontech®) después de que se escindiera el promotor temprano del citomegalovirus humano (CMV) (P_{CMV} IE) mediante AseI-Eco47 III. En el vector bicistrónico resultante (p α PIG) el promotor α MHC específico de tejido cardíaco dirige la expresión tanto de Pac como del marcador selectivo para fármacos y la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) como un gen indicador in vivo. La secuencia IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) proporciona la traducción independiente de ambas proteínas en células transfectadas estables. El vector contiene también los casetes de resistencia a kanamicina y neomicina para la selección de transfectantes en los cultivos de células bacterianas y ES, respectivamente.

Transfección y selección de los clones de células ES

[0126] Se electroporaron 5×10^6 células ES (línea D3, Doetschman y col., J. Embryol. Exp. Morph. 87 (1985), 27-45) con 30 μ g de ADN del vector p α PIG linealizado mediante SacI. Las células se sembraron en la placa de cultivo tisular de 10 cm que contenía una monocapa de células nodrizas resistentes a neomicina inactivadas con

mitomicina. Cuarenta y ocho horas después de la siembra, se añadió al medio de cultivo neomicina (G418) a 300 µg/ml para la selección de los clones de células ES transfectadas de forma estable. Ocho a diez días después del inicio de la selección se picaron las colonias de células ES supervivientes, se tripsinizaron y se propagaron finalmente en placas de 48 pocillos, 24 pocillos y 6 cm. Los clones resultantes se utilizaron en el protocolo de 5 diferenciación cardíaca para la selección.

10 **[0127]** La diferenciación se realizó según el protocolo convencional de "gota pendiente" como se describe en, por ejemplo, Maltsev y col., Circ. Res. 75 (1994), 233-244. Los días 8 a 10 de desarrollo los cuerpos embrioides (EB) con latido espontáneo que expresaban fluorescencia EGFP se trataron con puromicina a 10 µg/ml. La muerte celular con puromicina era evidente aproximadamente a las 12 horas de tratamiento cuando en el número de clones los grupos de cardiomiocitos con latido espontáneo de células positivas para EGFP no solo sobrevivían al tratamiento sino que también mostraban una intensificación de la frecuencia de latido. Ya después de 3 a 5 días de tratamiento los grupos de células con latido espontáneo intenso positivas para EGFP representaban la principal fracción celular en EB de las placas así como en los cultivos de EB en suspensión.

15 **[0128]** Se seleccionaron dos clones (αPIG10 y αPIG44) que mostraban la expresión específica cardíaca de ambos casetes de EGFP y resistencia a puromicina y se usaron en los experimentos adicionales.

20 **Ejemplo 2: Cocultivo de las células cardíacas derivadas de células ES purificadas y fibroblastos embrionarios de ratón**

25 **[0129]** Después de 7 a 10 días de tratamiento con puromicina, los grupos de células cardíacas con latido espontáneo positivas para EGFP se recogieron mediante centrifugación, se lavaron dos veces con PBS y se trataron con 0,1% de colagenasa B (Boehringer, Mannheim), durante 20 min a 37 °C. Tras 10 min y al final de la incubación la suspensión celular se pipeteó suavemente a través de una punta azul de una pipeta de 1 ml. Posteriormente, se añadieron uno, dos y de nuevo dos volúmenes de medio que contenían el 20% de suero fetal de ternera (FCS) y las células se centrifugaron y lavaron con este medio dos veces, se resuspendieron y se contaron con un microscopio de fluorescencia.

30 **[0130]** Se obtuvieron fibroblastos embrionarios de ratón a partir de embriones de 14 a 16 días según el procedimiento convencional, véase, por ejemplo, Joyner A.L. Gene targeting. A Practical Approach. Oxford University Press, 1993. Las células se crecieron hasta confluencia y se tripsinizaron con tripsina al 0,05%, se lavaron dos veces con medio que contenía FCS al 20% y se contaron. Para el cocultivo se mezclaron aproximadamente de 50x10³ a 100x10³ fibroblastos con una cantidad igual de los cardiomiocitos derivados de células ES y positivos para 35 EGFP y se dispusieron en un pocillo de las placas de 24 pocillos o, en algunos experimentos, en matrices de electrodos múltiples (MEA). Como se muestra en la fig. 4, un día después de la disposición en placa de forma conjunta, los fibroblastos formaron una monocapa mientras que los cardiomiocitos positivos para EGFP mostraban solo células individuales o grupos de células ligeramente pegados a los fibroblastos. Durante los siguientes días los cardiomiocitos positivos para EGFP derivados de células ES mostraban una completa integración y alineamiento con 40 los fibroblastos adquiriendo la morfología y orientación longitudinales según los fibroblastos circundantes (fig. 4). Las células cardíacas integradas con los fibroblastos embrionarios mostraban viabilidad y contractibilidad durante al menos algunas semanas como se mostró en el experimento de MEA (fig. 5). Para los registros extracelulares asistidos de la matriz de electrodos múltiples (MEA) se cultivaron los cardiomiocitos derivados de células ES y los fibroblastos sobre la matriz de electrodos múltiples (MEA; Multi Channel Systems, Reutlingen, Alemania) compuesta 45 de un sustrato de vidrio (5 cm x 5 cm) con 60 electrodos de nitruro de titanio (diámetro de 30 µm, espaciados 200 µm) en el centro de la MEA y un electrodo de referencia interno. Los registros electrofisiológicos extracelulares de los cardiomiocitos se realizaron con el sistema MEA60 (Multi Channel Systems, Reutlingen, Alemania). El sistema comprende el amplificador MEA-1060 (anchura de banda: de 10 Hz a 3 kHz; amplificación: 1200), el controlador de temperatura HC-X para mantener el medio de cultivo a 37°C y un sistema de ordenador para registrar los datos 50 medidos con el software MC-Rack. La velocidad de muestra de los registros era de 4 kHz.

Ejemplo 3: Cotrasplante de las células cardíacas derivadas de células ES purificadas y fibroblastos embrionarios de ratón

55 **[0131]** La línea de ratón SV129 se utilizó para la preparación de fibroblastos embrionarios mediante procedimientos convencionales (véase, por ejemplo, Joyner A.L. Gene targeting. A Practical Approach. Oxford University Press, 1993) para que coincidiera con el origen de los clones de células ES utilizados para la generación de cardiomiocitos. Se mezclaron de 50 x 10³ a 100 x 10³ de cardiomiocitos y fibroblastos purificados, y se inyectaron en los corazones crioinfartados de ratones SV129 como se describe en Roell y col., Circulation 105 (2002), 2435-

2441. Se detectaron cardiomiocitos que mostraban fluorescencia EGFP y estriado cruzado en corazones trasplantados durante el margen de tiempo de 10 a 70 días tras la operación (fig. 6) confirmando de este modo la viabilidad de las células cardíacas derivadas de células ES implantadas.

5 Ejemplo 4: Diseño principal de clones de células ES transgénicas para modelado de tejidos

Diseño del vector:

[0132] Los elementos básicos para los vectores son elementos reguladores genómicos específicos de tipo celular (denominados adicionalmente "promotores"), que incluyen promotores comunes y elementos potenciadores específicos. Típicamente, abarcan la región del extremo 5' de la región codificador del gen y, en ocasiones, incluyen también los fragmentos intrón-exón no traducidos. Los promotores determinan la activación específica de células del casete de resistencia a fármacos que es el segundo elemento básico del vector y normalmente va detrás del promotor justo en el extremo 5' de éste. Dicha combinación permite la eliminación de células ES no diferenciados junto con células en diferenciación hacia tipos celulares irrelevantes a partir del tipo celular de interés que activa el casete de resistencia a fármacos en el transcurso de la diferenciación.

[0133] Adicionalmente, se recomienda incluir en el vector un casete denominado proteína de color fluorescente en vivo unido a un casete de resistencia a fármacos a través de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Dichos vectores bicistrónicos permiten la transcripción de ambos casetes génicos de resistencia a fármacos e indicador en vivo a partir del mismo vector bajo un promotor específico del tipo celular. Posteriormente, el IRES permite la traducción ribosómica independiente de ambos casetes visualizando las células diferenciadas seleccionadas para su seguimiento. Hasta la fecha hay disponibles al menos tres versiones de color de proteína verde de fluorescencia potenciada (EGFP): EYFP (amarilla), ECFP (azul) y hCRFP (roja), para la visualización simultánea de al menos tres tipos celulares diferentes en el mismo cultivo. El diseño principal de dicho vector se muestra en la fig. 1.

Clones de ES transgénicos:

30 **[0134]**

El núcleo del procedimiento de la presente invención es una selección por fármacos paralela de tipos celulares que constituyen tejidos en interés en un cultivo de células ES en diferenciación. La ventaja de dicha técnica es que las interacciones entre los tipos de células purificadas se procesan de forma "natural" inmediatamente después de liberarse de células irrelevantes, usando señales naturales para la señalización de "interferencias" y formado de estructuras similares a tejido viables como resultado. Se presentan dos variantes de dicha técnica:

a) clones múltiples de células ES transgénicas transfectados de forma estable con un determinado número de vectores con casetes de selección por fármaco dirigidos por promotores específicos según los tipos celulares que constituyen el tipo tisular deseado. En esta variante todos los tipos celulares emergentes se originan a partir de un clon antecesor común de células ES y la proporción resultante entre los diferentes componentes celulares depende de la velocidad de diferenciación relativa de cada uno de ellos (fig. 2A y 3B);

b) cuerpos embrioides (EB) quiméricos: mediante esta técnica se generan varios clones de células ES transgénicos, donde cada clon individual posee solo un vector con un casete de resistencia a fármacos dirigido por uno de los promotores específicos de tipo celular. Para la formación del tejido los clones relevantes se mezclan en la fase inicial de diferenciación ("gotas colgantes" o "cultivo en masa") para formar agregados de células ES (EB) donde, tras la selección por fármacos, surgen tipos celulares que tienen su origen en los correspondientes clones celulares de ES diferentes y la proporción final de los componentes celulares también depende y puede controlarse mediante la proporción final entre diferentes líneas células de ES (fig. 2B y 3C).

Ejemplo 5: Modelado del tejido cardíaco en un sistema de células ES

[0135] Se estableció un sistema para la selección por fármaco de los cardiomiocitos derivados de células ES en base al esquema principal descrito anteriormente de los vectores bicistrónicos. Para este fin, el promotor específico de tejido cardíaco para la cadena pesada de α -miosina (promotor α MHC) y el casete de resistencia a puromicina se han insertado como un "promotor específico de tipo celular" y "casete de resistencia a fármacos para la selección de tipo celular" (fig. 1 y 3A), respectivamente, en el vector pIRES2-EGRP (Clontech®) que posee un IRES, y proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) como "IRES" y "casete indicador de fluorescencia en vivo"

(fig. 1), respectivamente; véanse también los ejemplos 1 y 2 de la solicitud internacional WO02/051987. Este sistema permite una purificación rápida y eficaz de los cardiomiocitos viables adecuados para el trasplante. Se comprueban las ventajas obvias de este sistema mediante la posibilidad de controlar la diferenciación, selección específica cardíaca y el destino de las células trasplantadas. También se ha mostrado que los cardiomiocitos purificados con puromicina se integran y alinean por completo con los fibroblastos embrionarios durante algunos días en cocultivo (fig. 4). En dicho cocultivo los cardiomiocitos purificados derivados de células ES mantenían un buen estado funcional al menos durante dos semanas cuando se registraban la contracción espontánea y la señal de potencial de campo (PC) mediante las medidas de matrices de electrodos múltiples (MEA) (fig. 5).

10 **[0136]** Los fibroblastos se conocen como un elemento celular clave para el tejido conjuntivo en especies de mamíferos y no mamíferos. Especialmente en el corazón de ratón constituyen hasta el 50% del corazón embrionario y hasta el 80% del corazón adulto. Otro elemento no cardíaco importante del tejido cardíaco está representado por las células endoteliales como elemento celular principal para capilares y vasos que poseen una función trófica importante. Por tanto, se prevé que las células cardíacas derivadas de células ES, endoteliales y fibroblastos puedan
15 constituir un conjunto suficiente para formar un tejido similar al cardíaco.

Diseño de vectores y clones de células ES:

20 **[0137]**

1) Para el vector específico de tejido cardíaco, puede usarse el promotor α MHC mencionado anteriormente u otros promotores específicos de tejido cardíaco (MLC2v, MLC1a, MLC2a, β -MHC, etc.) como "promotor específico de tipo celular" y la proteína ciano fluorescente potenciada (ECFP, Clontech®) como gen indicador en vivo junto con casetes de IRES y puromicina (o algún otro marcador selectivo) según la fig. 3A.

25

2) Para el vector específico endotelial, puede usarse Tie2 (u otros promotores específicos de endotelio como Tie1, cadherina, etc.) como "promotor específico de tipo celular" y la proteína amarilla fluorescente potenciada (EYFP, Clontech®) como gen indicador en vivo junto con casetes de IRES y puromicina (o algún otro marcador selectivo) según la fig. 3A.

30

3) Para el vector específico de fibroblastos, puede usarse colágeno I (u otros promotores específicos de fibroblastos) como "promotor específico de tipo celular" y la proteína hcRed fluorescente (hcRFP, Clontech®) como gen indicador en vivo junto con casetes de IRES y puromicina (o algún otro marcador selectivo) según la fig. 1.

35 **[0138]** El diseño, diferenciación y esquemas de selección de clones de células ES pueden realizarse según los dos principios principales descritos anteriormente. "Tres vectores - Un clon" (fig. 3B) o "Tres vectores - Tres clones" (fig. 3C). La transfección y selección de tipos celulares derivados de células ES y el trasplante se realizan como se describe en la solicitud internacional WO02/051987; véase en especial los ejemplos 1 y 2 del documento WO02/051987 y las referencias citadas en el mismo.

40

[0139] El uso de tres vectores indicadores de fluorescencia en vivo permite hacer un seguimiento de la diferenciación, la selección y las conexiones intercelulares durante la formación del tejido en un cultivo en modo "en vivo". La formación *in vitro* de la estructura similar a tejido cardíaco en el cultivo de células ES puede usarse como un sistema fisiológico significativo para comprobar diferentes sustancias cardiotróficas y cardiotóxicas en
45 experimentos bioquímicos y electrofisiológicos (MEA). Adicionalmente, podría convertirse en una fuente relevante de material trasplantado en la terapia de sustitución de enfermedades cardíacas.

Ejemplo 6: Sistema transgénico doble para la selección cardiovascular en el sistema de células ES

50 **[0140]** El objetivo principal de este experimento era una selección paralela de los dos tipos celulares derivados de células ES estrechamente relacionados entre sí tanto funcionalmente como por su origen mesodérmico común. Para este fin, se generaron clones dobles de células ES transgénicas estables, donde un vector posea un casete de resistencia a fármacos bajo el control del promotor específico de tejido cardíaco mientras que el segundo posee ambos casetes de resistencia a fármacos e indicador de fluorescencia en vivo bajo el control del promotor
55 específico endotelial. Las células cardíacas y endoteliales aparecen muy pronto en el desarrollo embrionario real y constituyen elementos funcional y anatómicamente muy estrechamente relacionados de la formación del corazón. Por tanto, se previó que siendo seleccionados de forma eficaz a partir de un cultivo de células ES en diferenciación, estos tipos celulares mostrarían patrones de autoensamblaje dirigidos por pistas similares a las que se producían durante una cardiogénesis embrionaria real. En la primera versión experimental, las células similares a endoteliales

tenían que identificarse mediante la fluorescencia de la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) mientras que las células similares a cardiomiocitos incoloras se identificaban mediante la detección de los grupos contráctiles. En experimentos adicionales se generaron cuerpos embrioides que constaban del clon mencionado anteriormente y de otro clon transgénico que poseía la proteína roja fluorescente (HcRFP) y un casete de resistencia a fármacos ambos dirigidos por un promotor específico de tejido cardíaco. Por tanto, este último experimento permitía visualizar la diferenciación y selección de ambos tipos celulares cardíacas y endoteliales.

Vectores:

10 **[0141]**

1) Para el vector α MHC-Pac se escindió el casete de resistencia a puromicina (Pac) del vector pCre-Pac (Taniguchi y col., Nucleic Acid Research 26 (1998), 679-680) mediante las enzimas de restricción HindIII-Sall y se ligó mediante extremos romos en el vector α MHC-EGFP tras la delección del casete EGFP mediante las enzimas BamHI-AflIII.

15

Para la electroporación de las células ES se utilizó el vector resultado de la linealización con HindIII.

2) Para el vector pTie2 -Pac-IRES-EGFP (pTie2-PIG) se escindió el casete Pac-IRES-EGFP del vector pPIG mediante Sall-AflIII y se insertó mediante ligamiento con extremos romos en el sitio NotI del vector pSPTg.T2FXX (Schlaeger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 3058-3063) entre el promotor de Tie2 y el potenciador de Tie2.

Para la electroporación de células ES, el fragmento promotor de Tie2-PIG-potenciador de Tie2 se escindió a partir del vector resultante mediante Sall y se purificó mediante electroforesis en el gel de agarosa al 1%.

25

3) Para el vector α MHC-hcRFP se escindió el fragmento de 5,5 kb del promotor de tejido cardíaco α MHC mediante BamHI-Sall a partir de α MHC-BS2SK⁺ (Robbins, Trends Cardiovasc. Med. 7 (1997), 185-191) y se ligó mediante extremos romos en el sitio SmaI del pHcRed1-1 (Clontech®, USA).

30 Protocolos de cultivo, transformación y diferenciación de células ES:

[0142] Se cultivaron células ES y se realizó la electroporación según se ha descrito (Kolossoy y col., J. Cell Biol. 143 (1998), 2045-2056). Se cotransfectaron 5×10^6 células ES (línea D3) con 30 μ g de ADN de cada α MHC-Pac y fragmentos promotor Tie2-PIG-potenciador Tie2. Los clones resistentes a G418 se seleccionaron, propagaron y sometieron a diferenciación como se ha descrito (Kolossoy y col., J. Cell Biol. 143 (1998), 2045-2056). Para la generación de los EB quiméricos, se mezclaron suspensiones de las células de los clones transgénicos Tie2-PIG/ α MHC-Pac y α MHC-hcRFP/ α MHC-Pac hasta una densidad celular de $0,01 \times 10^6$ células de cada clon por ml (200 células de cada clon por gota).

[0143] Se realizó un control de los EB a través de un microscopio de fluorescencia Axiovert 200M (Zeiss, Alemania).

Clon Tie2-PIG/ α MHC-Pac:

[0144] Las contracciones espontáneas se iniciaron los días 8 a 10 de desarrollo. Los días 11 a 14 se detectaron las primeras células positivas para EGFP exclusivamente en los EB con latido espontáneo en las zonas que solapaban o muy próximas a los grupos celulares contráctiles cardíacos. En este momento, se añadió puromicina (5 μ g/ml) y, a continuación, se cambió el medio cada 2 a 3 días. Durante los días siguientes se detectó un aumento de contractibilidad de los grupos celulares cardíacos junto con un aumento de la expresión de EGFP. Al mismo tiempo se registró la muerte intensiva de las células no resistentes a puromicina. Típicamente, ya aproximadamente 4 días después del tratamiento con puromicina las células positivas para EGFP formaron una red incluida en grupos celulares con latido espontáneo vigoroso de células cardíacas. Después de 10 o más días de tratamiento con puromicina, la intensidad de fluorescencia aumentaba drásticamente.

55 EB quiméricos: clon Tie2-PIG/ α MHC-Pac + clon α MHC-hcRFP/ α MHC-Pac:

[0145] Al igual que los EB del clon descrito anteriormente los EB quiméricos mostraban el mismo tiempo de expresión de EGFP en las zonas con latido espontáneo. De forma simultánea, se detectó una intensa fluorescencia RFP en las mismas zonas con latido espontáneo marcándose de este modo los cardiomiocitos diferenciados.

Notablemente, los grupos celulares con fluorescencia EGFP y RFP se solapaban en el espacio aunque no estaban completamente superpuestos ya que como grupos celulares con latido espontáneo presentaban una clara estructura en mosaico verde y roja. Tanto la fluorescencia verde como la roja aumentaban significativamente durante el tratamiento con puromicina.

5

[0146] Por tanto, los experimentos mencionados anteriormente muestran inequívocamente una conexión clara y fuerte entre la diferenciación cardíaca y endotelial en el sistema de células ES: los EB sin actividad contráctil no expresaban tampoco ninguna fluorescencia EGFP. Ambos tipos de células mostraron también una alta coincidencia espacial en la mayoría de las zonas con células que expresaban EGFP que se localizaban muy próximas a grupos de células con latido espontáneo o se solapaban completamente con ellos. Tras el tratamiento con puromicina las conexiones entre estos dos tipos de células resultaban obvias: tras la muerte de la mayoría de las células indiferenciadas las redes de células fluorescentes EGFP estaban incluidas en los grupos de células cardíacas con latido espontáneo mostrando con frecuencia signos de orientación estructural. De forma notable, la intensidad de fluorescencia de EGFP aumentaba drásticamente durante el tratamiento con puromicina lo que sugería la proliferación de células endoteliales tras la liberación de las células ES indiferenciadas como se ha comprobado para las células cardíacas según la presente invención.

10

15

Las estrechas conexiones entre elementos cardíacos y endoteliales especialmente evidentes en las imágenes de fluorescencia multicolor de grupos celulares con latido espontáneo permiten considerar a estas estructuras como un posible prototipo de estructura similar a tejido cardiovascular creado mediante la selección por fármaco a partir de diferentes cultivos de células ES multitransgénicas.

20

[0147] Finalmente, los datos presentados apuntan hacia la viabilidad principal del "modelado de tejidos" mediante la selección multilínea en un sistema de células ES multitransgénico.

25

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de modelado y/u obtención de tejido cardíaco o estructuras similares a tejido cardíaco que comprenden cultivar un primer tipo celular derivado de células madre embrionarias (ES) en presencia de al menos un segundo tipo celular embrionario, y permitir la integración y alineamiento de dichos al menos dos tipos celulares en el tejido o estructuras similares a tejido;
- siempre que las células no deriven de un embrión humano.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula de dicho primer tipo celular derivado de célula comprende un marcador seleccionable unido de forma operativa a una primera secuencia reguladora específica de tipo celular específica para dicho primer tipo celular.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicho marcador seleccionable confiere resistencia a puromicina.
- 15 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha célula de dicho primer tipo celular derivado de célula comprende un gen indicador unido de forma operativa a una secuencia reguladora específica de tipo celular específica para dicho primer tipo celular.
- 20 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicha secuencia reguladora específica de tipo celular del gen indicador es sustancialmente la misma que dicha primera secuencia reguladora específica de célula del gen marcador.
- 25 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho indicador se selecciona a partir de las diferentes versiones de color de la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP).
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho primer tipo celular son cardiomiocitos.
- 30 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicha primera secuencia reguladora específica de tipo celular es preferiblemente específica de aurícula y/o ventrículo.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que además comprende cultivar dichos al menos dos tipos celulares en presencia de un tercer tipo celular embrionario o derivado de células ES, siempre que la célula no derive de un embrión humano.
- 35 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicho tercer tipo celular son células endoteliales o fibroblastos.
- 40 11. Un cocultivo de células como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende al menos células de dicho primero y segundo tipo celular en condiciones, en el que dichas células son capaces de integrarse y alinearse en el tejido cardíaco o estructuras similares a tejido, en el que la célula de dicho primer tipo celular derivado de células comprende un marcador seleccionable y/o un gen indicador unidos de forma operativa a una primera secuencia reguladora específica de tipo celular específica para dicho primer tipo celular, siempre que las células no deriven de un embrión humano.
- 45 12. Un tejido cardíaco que se obtiene mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que la célula de dicho primer tipo celular derivado de célula comprende un marcador seleccionable y/o un gen indicador unidos de forma operativa a una primera secuencia reguladora específica de tipo celular específica para dicho primer tipo celular.
- 50 13. Procedimiento de modelado y/u obtención de tejido cardíaco o estructuras similares a tejido que comprende las etapas siguientes:
- 55 (a) transfectar una o más células ES con moléculas de ácido nucleico recombinantes que comprenden una primera y una segunda secuencia reguladoras específicas de tipo celular unidas de forma operativa a al menos un marcador seleccionable, en el que dicho segundo tipo celular es diferente de dicho primer tipo celular;

(b) cultivar las células en condiciones que permitan la diferenciación de las células; y

(c) aislar células de al menos dos tipos celulares diferenciados y/o eliminar las células no diferenciadas, opcionalmente junto con células en diferenciación hacia tipos celulares irrelevantes a partir de los tipos celulares de interés que activen el marcador seleccionable en el transcurso de la diferenciación siempre que las células no deriven de un embrión humano.

14. El procedimiento de la reivindicación 13, que además comprende transfectar dicha una o más células con moléculas de ácido nucleico recombinantes que comprenden al menos una secuencia reguladora específica de tipo celular adicional unida de forma operativa a al menos un marcador seleccionable, en el que dicho al menos un tipo celular adicional es diferente de dichos primer y segundo tipos celulares.

15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 13 o 14, en el que la secuencia reguladora es un promotor seleccionado a partir del grupo compuesto por los promotores de α MHC, MLC2V, cadherina, Tie-2 y colágeno.

16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que se transfectan y seleccionan al menos dos células o clones de las mismas diferentes, en el que dichas al menos dos células o clones celulares diferentes contienen moléculas de ácido nucleico recombinantes con secuencias reguladoras específicas de tipo celular diferentes.

17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que dichas al menos dos células o clones celulares diferentes se mezclan en el estadio inicial de diferenciación para permitir la formación de agregados celulares.

18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que dichos agregados celulares son cuerpos embrioides (EB) quiméricos.

19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en el que se transfecta y selecciona una de dichas células o clones celulares de las mismas, en el que dicha célula o clon celular contiene moléculas de ácido nucleico recombinantes con al menos dos secuencias reguladoras específicas de tipo celular diferentes.

20. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19, en el que al menos dos de dichos marcadores seleccionables unidos de forma operativa a dichas secuencias reguladoras diferentes específicas de tipo celular son idénticos.

21. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, en el que al menos uno de dicho marcador seleccionable unido de forma operativa a dichas secuencias reguladoras específicas de tipo celular diferentes confiere resistencia a puromicina, bleomicina, higromicina, metotrexato o neomicina.

22. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 21, en el que una o más de dichas moléculas de ácido nucleico recombinantes además comprenden un indicador unido de forma operativa a dicha secuencia específica de tipo celular.

23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que dicho indicador se selecciona a partir de las diferentes versiones de color de la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP).

24. El procedimiento de la reivindicación 23, en el que EYFP (amarilla), ECFP (azul) y/o hcRFP (roja) se unen de forma operativa a secuencias específicas de tipo celular diferentes.

25. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en el que dicho marcador seleccionable y dicho indicador se expresan a partir de un vector bicistrónico.

26. El procedimiento de la reivindicación 25, que además comprende uno o más sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), en el que dicho IRES separa dicho marcador seleccionable y dicho indicador.

27. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 26, que además comprende permitir el autoensamblaje de los diferentes tipos celulares.

28. Una célula o células que se obtienen mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 27, en el que dicha célula o células son capaces de diferenciarse en al menos dos tipos celulares y en el que dichas células son capaces de integrarse y alinearse en el tejido cardíaco o estructuras similares a tejido.
29. Un agregado celular de al menos dos tipos celulares diferentes que se obtienen mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 27 y en el que dichas células son capaces de integrarse y alinearse en el tejido cardíaco o en estructuras similares a tejido.
30. Un tejido cardíaco que se obtiene mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 27, o comprende células de la reivindicación 28 o un agregado celular de la reivindicación 29, o un órgano que comprende células de la reivindicación 28, un agregado celular de la reivindicación 29 o tejido de la reivindicación 12.
31. Un tejido cardíaco, implante o trasplante similar a tejido que comprende células de la reivindicación 28, un agregado celular de la reivindicación 29, un tejido de la reivindicación 12 o 30 o un órgano de la reivindicación 30.
32. Una composición en cuestión que comprende células de la reivindicación 28, un agregado celular de la reivindicación 29 o un tejido de la reivindicación 12 o 30.
33. Un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica para mejorar la función cardíaca en un mamífero tras un infarto de miocardio, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- (a) transfectar células ES de mamífero con una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un gen de resistencia bajo en control de secuencias reguladores específicos cardíacas, de fibroblastos y/o de endotelio y que, opcionalmente, comprende uno o más indicadores bajo las mismas secuencias reguladoras específicas;
- (b) cultivar dichas células *in vitro* en un medio de cultivo que contiene el agente selectivo para el gen de resistencia en condiciones que permitan la diferenciación de dichas células en cardiomiocitos, fibroblastos y/o células endoteliales;
- (c) eliminar a partir de dichos cardiomiocitos, fibroblastos y/o células endoteliales diferenciadas células no diferenciadas, opcionalmente junto con células en diferenciación hacia tipos celulares irrelevantes; opcionalmente
- (d) permitir el alineamiento y la integración de dichos cardiomiocitos, fibroblastos y/o células endoteliales en diferenciación en un tejido similar a cardíaco,
- en el que dicha composición farmacéutica se diseña para cotrasplantar posteriormente dichos cardiomiocitos y dichos fibroblastos y/o células endoteliales o dicho tejido a al menos una porción de la zona previamente infartada del tejido cardíaco, y/o permitir que dichas células o tejido se implantan *in situ* como células viables situadas dentro de la zona previamente infartada del tejido cardíaco, en el que el implante tiene como resultado una mejora de la función cardíaca en dicho mamífero; siempre que las células no deriven de un embrión humano.
34. El procedimiento de la reivindicación 33, en el que dicha secuencia reguladora específica cardíaca se selecciona entre los promotores de α MHC, MLC22v, MLC1a, MLC2a y β MHC, dicha secuencia reguladora específica de fibroblastos se selecciona entre los promotores de Tie2, Tie1 y cadherina, y dicha secuencia reguladora específica de endotelio se selecciona entre los promotores del colágeno I.
35. El procedimiento de la reivindicación 33 o 34, en el que dicho indicador para dichos cardiomiocitos, fibroblastos y/o células endoteliales se selecciona independientemente a partir de las proteínas verdes de fluorescencia potenciadas ECFP (azul), EYFP (amarilla) y hCRFP (roja).
36. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35, en el que dicho gen de resistencia y dicho indicador están separados por un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES).
37. Uso de un vector o una composición de vectores en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 36, comprendiendo dicho vector o composición de vectores las moléculas de ácido nucleico recombinante como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 36.

38. Uso de una célula o diversidad de células en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 36, comprendiendo dicha célula o diversidad de células el vector o la composición de vectores de la reivindicación 37, siempre que las células no deriven de un embrión humano.
- 5
39. Una matriz que comprende un soporte sólido y células unidas al mismo o suspendidas en él de la reivindicación 28, un agregado de la reivindicación 29 o un tejido de la reivindicación 12 o 30.
40. La matriz de la reivindicación 39, que es una matriz de microelectrodos (MEA).
- 10
41. Un procedimiento para la selección y/u obtención del perfil de una sustancia de ensayo capaz de influir sobre el desarrollo de las células cardíacas y/o la formación de la estructura del tejido cardíaco que comprende las etapas del procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 13 a 27 y además comprende las etapas de:
- 15
- (a) poner en contacto una muestra de ensayo que comprende células de la reivindicación 28 o 38, un agregado celular de la reivindicación 29, un tejido de la reivindicación 12 o 30, un órgano de la reivindicación 30 o una matriz de la reivindicación 39 o 40 con una sustancia de ensayo y
- 20
- (b) determinar una respuesta fenotípica en dicha muestra de ensayo en comparación con una muestra control, en la que un cambio en la respuesta fenotípica de dicha muestra de ensayo en comparación con la muestra control es una indicación de que dicha sustancia de ensayo tiene un efecto sobre el desarrollo celular y/o la formación de la estructura tisular.
- 25
42. El procedimiento de la reivindicación 41, que se realiza en una matriz como se define en la reivindicación 39 o 40.
43. El procedimiento de la reivindicación 41 o 42, en el que la respuesta fenotípica comprende propiedades electrofisiológicas durante el proceso de diferenciación en curso.
- 30
44. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 13 a 27 o 41 a 43, en el que dicha una o más células se manipulan mediante ingeniería genética para (sobre)expresar o inhibir la expresión de un gen diana.
- 35
45. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 13 a 27 o 41 a 44, en el que se añade al medio de cultivo un compuesto conocido por activar o inhibir el proceso de diferenciación y/o la formación de estructura tisular.
46. Uso de un kit o composición para realizar un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 40 1 a 10, 13 a 27, 33 a 36 o 41 a 45, conteniendo dicho kit o composición el vector o la composición de vectores de la reivindicación 37, una célula pluripotente y, opcionalmente, medio de cultivo, moléculas de ácido nucleico recombinante o compuestos convencionales;
- 45
- siempre que la célula no derive de un embrión humano.

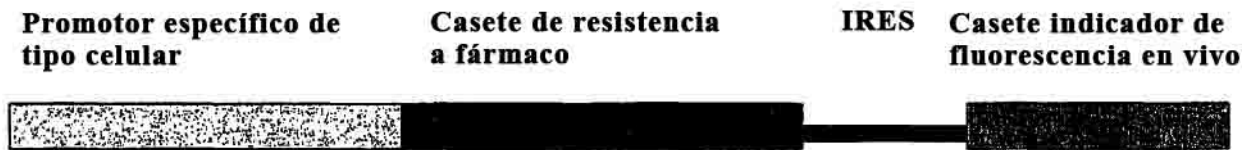


Figura 1

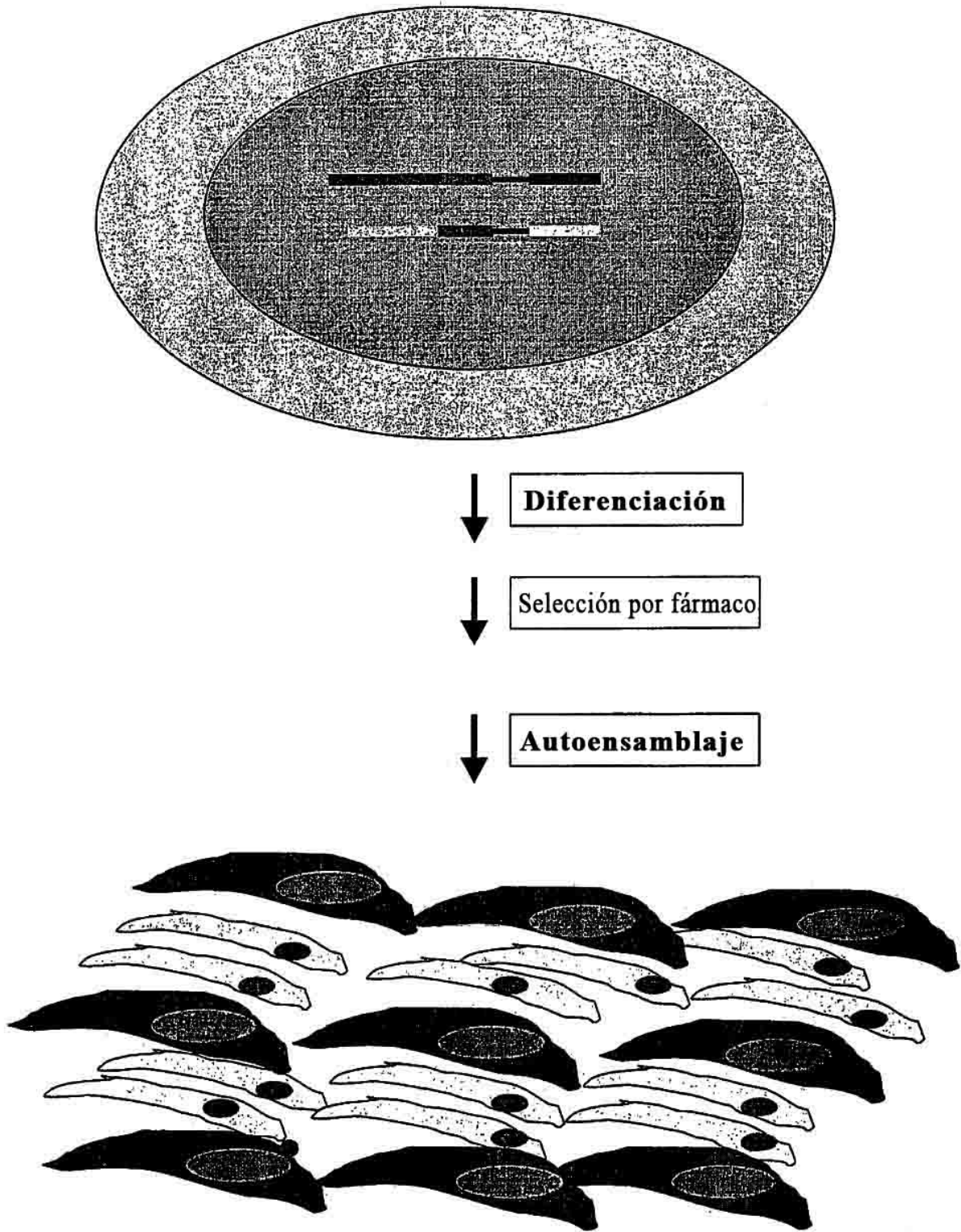


Figura 2

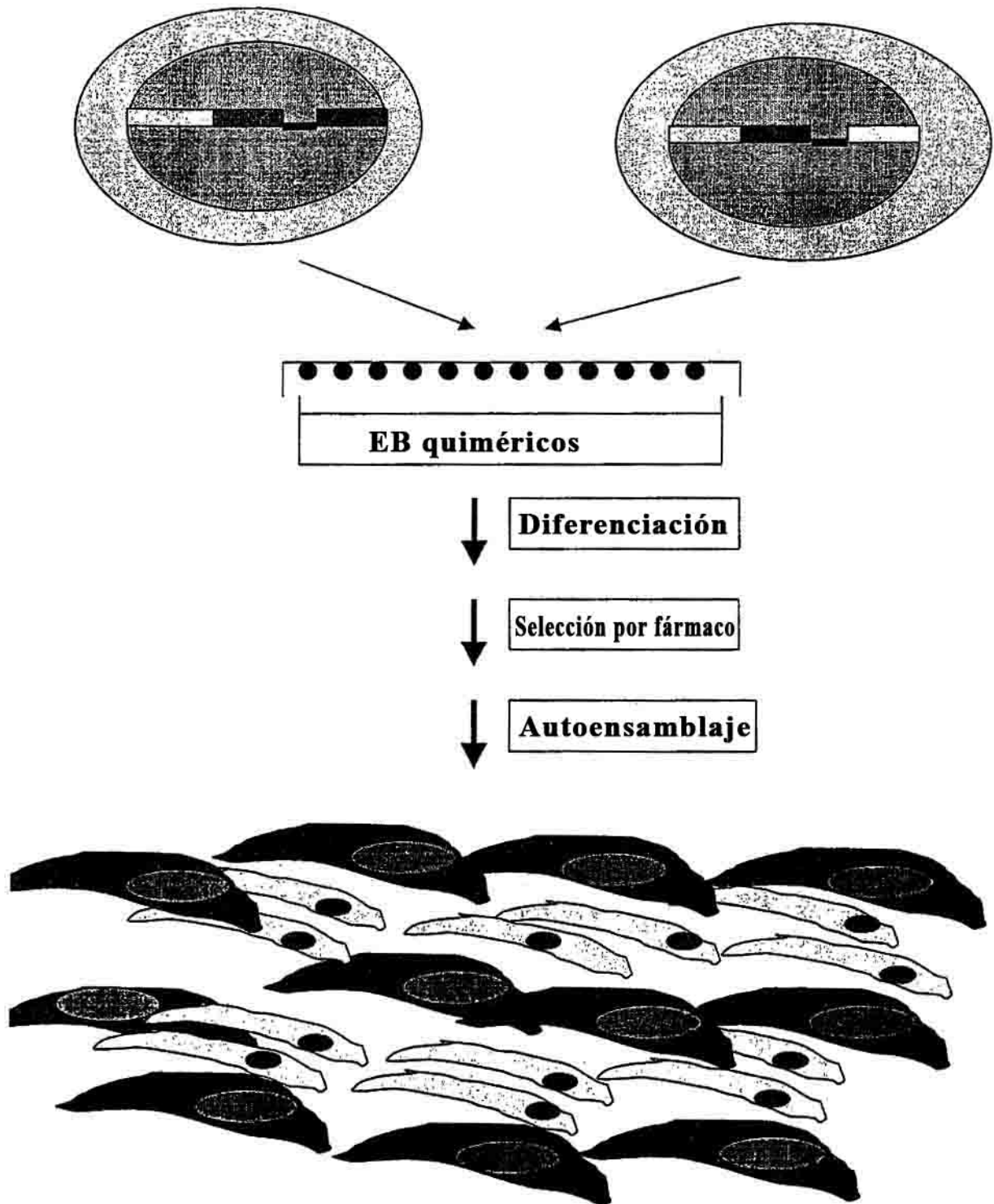


Figura 2 continuación

A

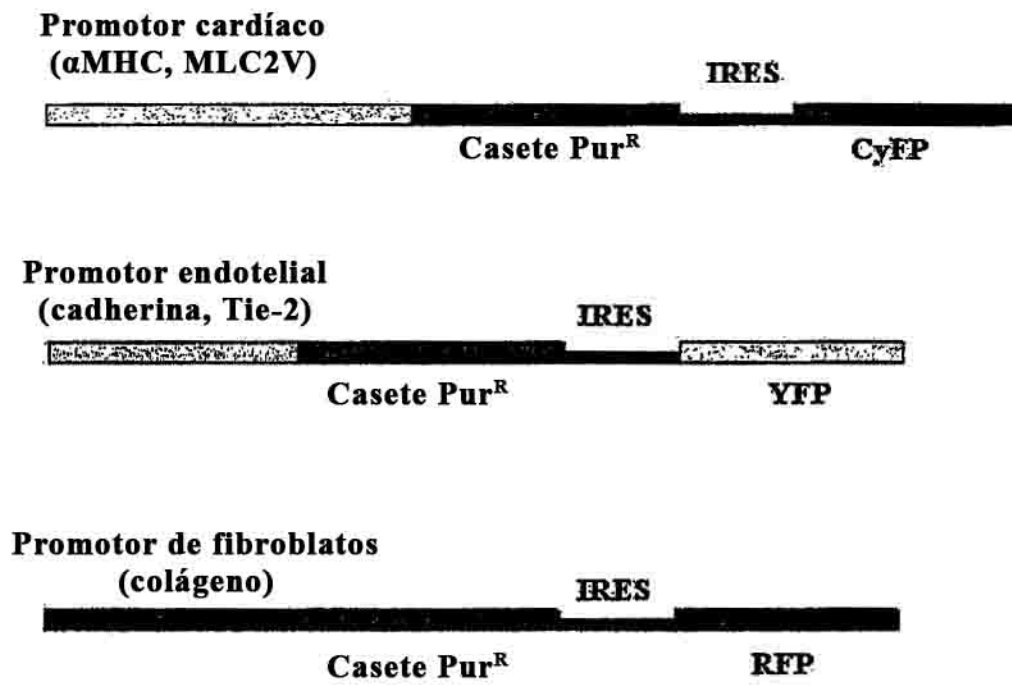


Figura 3

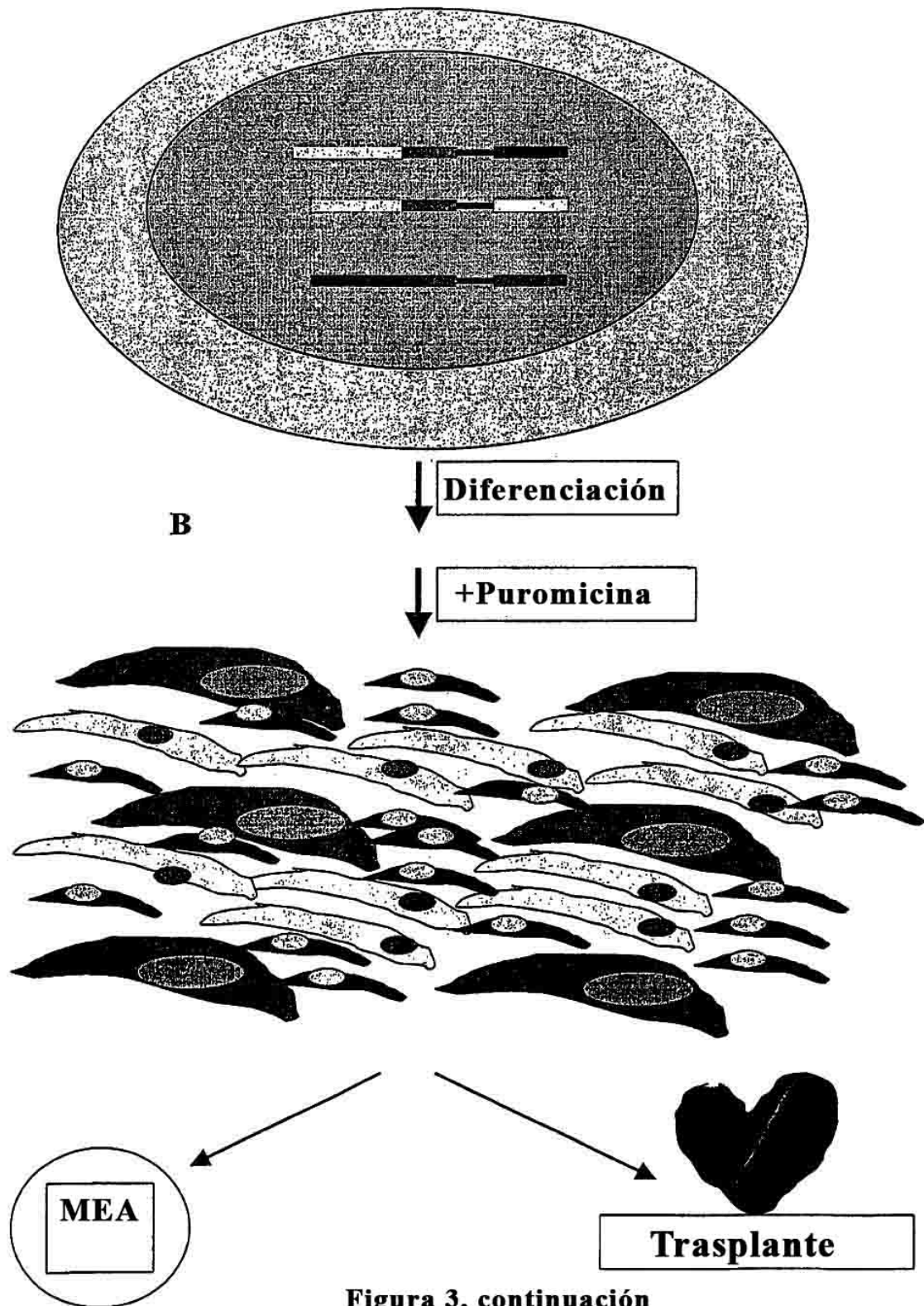


Figura 3, continuación

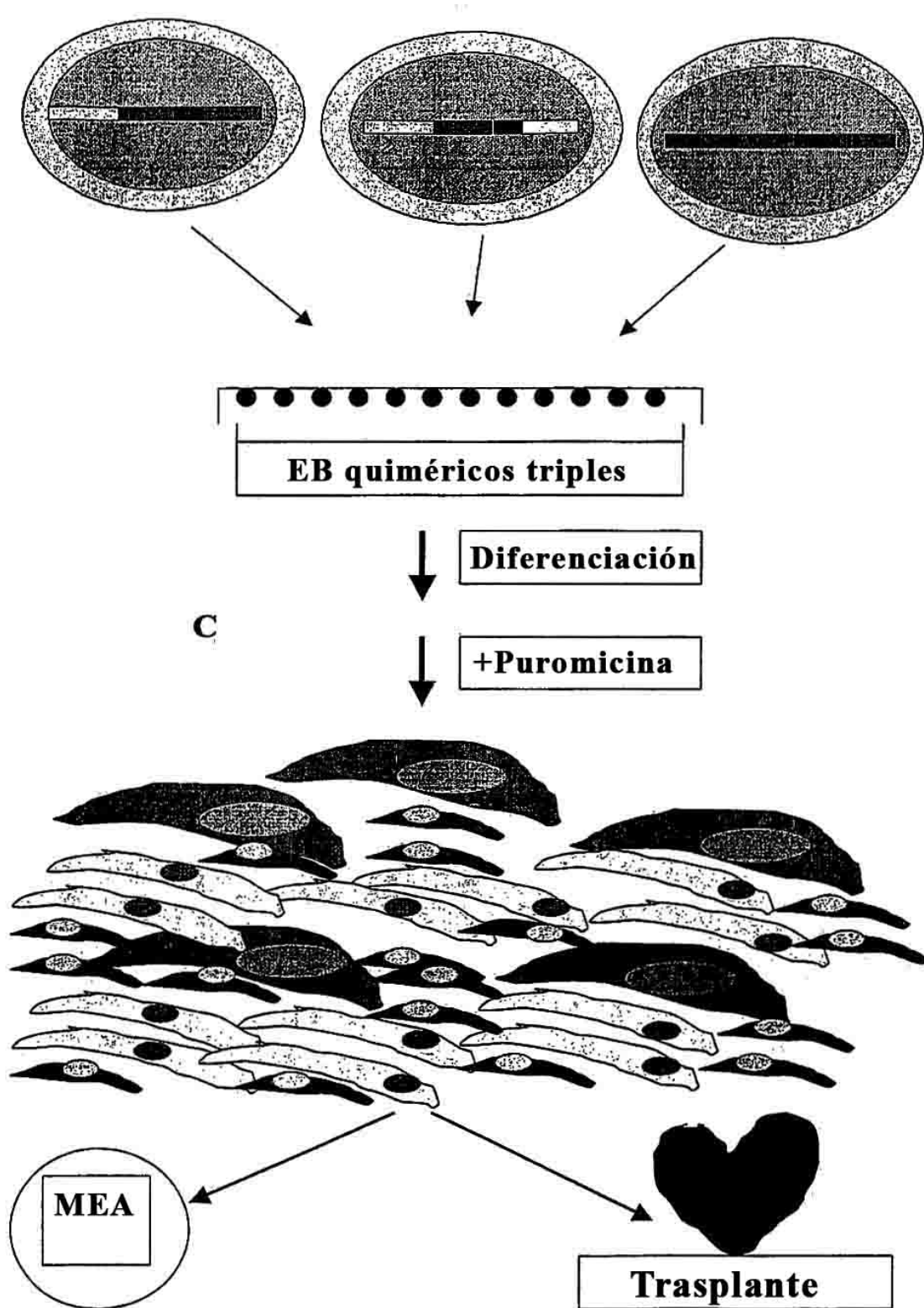


Figura 3, continuación

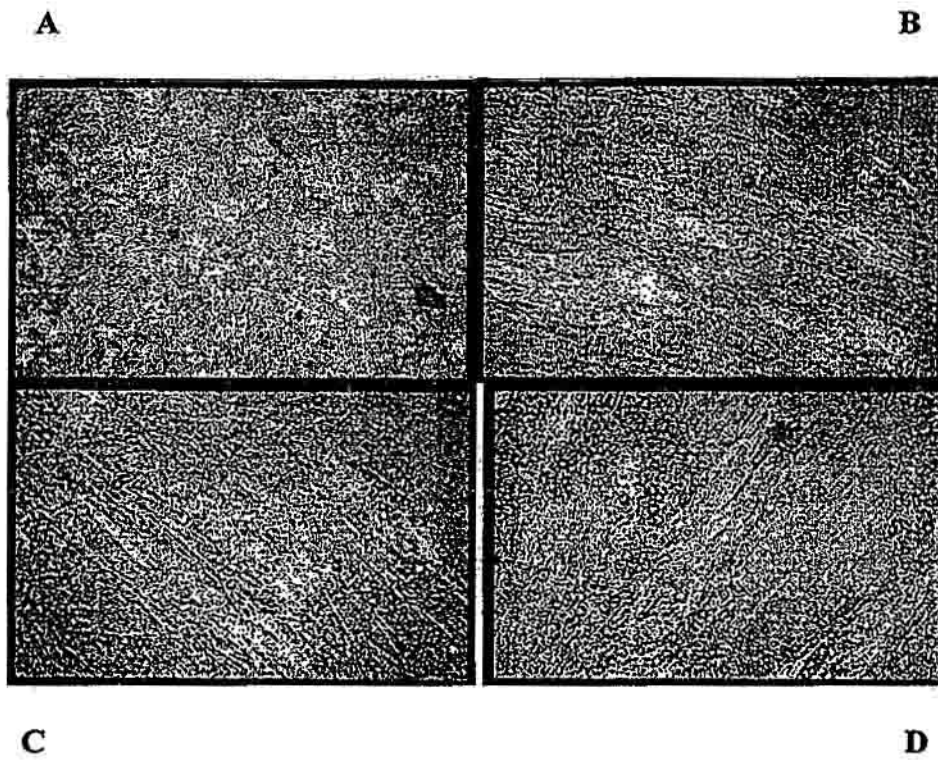


Figura 4

A



B

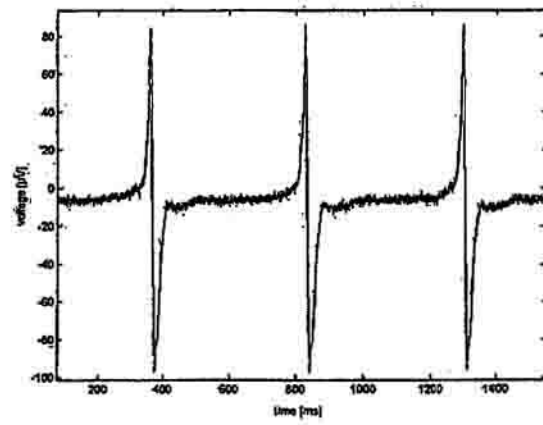


Figura 5

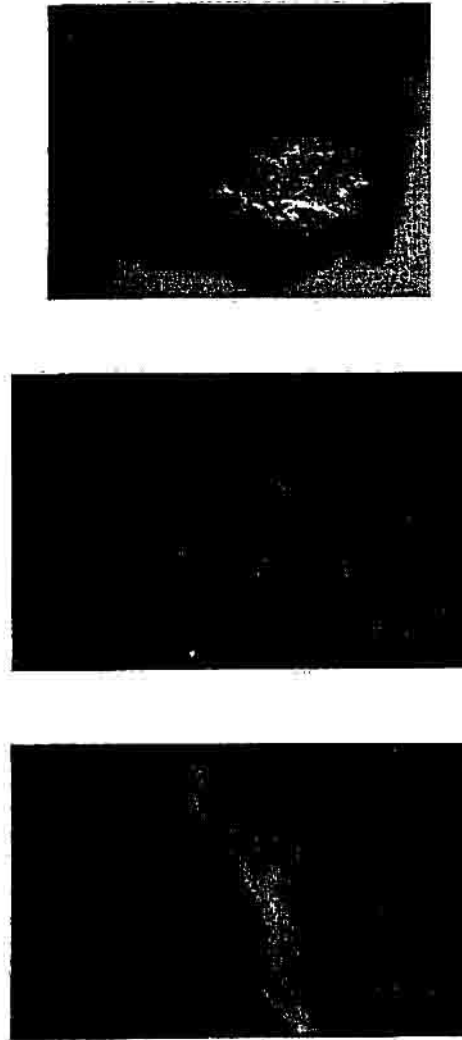


Figura 6