

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 319**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 35/34 (2015.01)

C12N 5/077 (2010.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2012 PCT/US2012/064204**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13070952**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2012 E 12847179 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2776071**

54 Título: **Generación de células marcapasos basada en factor de transcripción y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:
09.11.2011 US 201161557812 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.10.2018

73 Titular/es:
**CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER (100.0%)
8700 Beverly Boulevard
Los Angeles, CA 90048, US**

72 Inventor/es:
**MARBAN, EDUARDO y
CHO, HEE, CHEOL**

74 Agente/Representante:
SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 685 319 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

Generación de células marcapasos basada en factor de transcripción y métodos de uso de las mismas

Aplicaciones relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/557,812, presentada el 9 de noviembre.

Antecedentes

Campo de la invención

10 Varias realizaciones de la presente solicitud se refieren en general a métodos y composiciones para la generación de células marcapasos (por ejemplo, células cardíacas que tienen actividad eléctrica rítmica regular). En particular, algunas realizaciones de la invención se refieren a métodos de terapia génica y celular (y composiciones asociadas) para generar células marcapasos que usan Tbx18 o fragmentos funcionales del mismo capaces de convertir células quiescentes o células madre en células marcapasos. La invención se define adicionalmente en las reivindicaciones.

Descripción de la técnica relacionada

15 Durante la cardiogénesis, los cardiomiocitos se especializan para presentar ya sea propiedades ventriculares, auriculares o de marcapasos. El nodo sinoauricular (SAN), la región primaria del marcapasos del corazón, es una estructura altamente especializada que contiene menos de 10,000 células marcapasos, que funcionan para iniciar contracciones en el SAN. Estas contracciones de SAN se propagan al resto del tejido cardíaco excitable y dan como resultado un latido del corazón. Las irregularidades del tejido cardíaco excitable y/o las irregularidades de las células marcapasos pueden provocar anomalías en el ritmo cardíaco. Muchas anomalías cardíacas por lo general implican latidos cardíacos irregulares, taquicardia (donde la frecuencia cardíaca es demasiado alta) o bradicardia (donde la frecuencia cardíaca es demasiado lenta). Estas anomalías se conocen colectivamente como arritmias.

25 Las terapias actuales para arritmias cardíacas por lo general dependen de la terapia farmacéutica, ablación, dispositivos de marcapasos electrónicos o combinaciones del mismo. Sin embargo, la utilidad de cada una de estas terapias ha tenido un éxito limitado y variable. Si bien los medicamentos antiarrítmicos se recetan y usan ampliamente, pueden dar lugar a efectos secundarios sistémicos adversos en ciertas poblaciones de pacientes. Además, muchos fármacos tienen una propensión a provocar nuevos eventos arrítmicos, que pueden conducir a un aumento de la morbilidad. La ablación por radiofrecuencia se usa en algunos tratamientos de arritmias. La ablación implica la eliminación permanente del tejido identificado como la fuente de, o crítico para, el mantenimiento de las arritmias. Si bien este método ha tenido cierto éxito en el tratamiento de la taquicardia por reentrada de los nódulos auriculoventriculares, la taquicardia de las vías accesorias y el aleteo auricular, ha encontrado un éxito limitado en el tratamiento de otras arritmias. Por ejemplo, la ablación con catéter tiene menos éxito en el tratamiento de casos más complejos, tal como la fibrilación auricular (AF) o la taquicardia ventricular (TV). Además, la ablación con catéter no es útil en el tratamiento de la bradicardia. Los dispositivos de marcapasos electrónicos pueden mantener la frecuencia cardíaca o administrar descargas para interrumpir las taquicardias. Sin embargo, el alto costo de los dispositivos y las complicaciones tales como el colapso pulmonar, la hemorragia, las infecciones bacterianas y la falla del conductor/generador u otros tipos de mal funcionamiento representan limitaciones de la tecnología.

Resumen

40 A la luz de las limitaciones asociadas con las terapias tradicionales para las disfunciones de ritmo cardíaco y arritmias, existe una necesidad de métodos y composiciones alternativas que puedan usarse para modular el ritmo cardíaco y el ritmo para tratar arritmias cardíacas (variedades simples y complejas), para tratar la insuficiencia cardíaca (como en aplicaciones de resincronización cardíaca de marcapasos electrónicos), y/o para complementar u obviar la necesidad de marcapasos de potencia eléctrica.

45 Actualmente, los marcapasos biológicos por lo general provocan sus efectos a través de la administración génica de nucleótidos que transcriben proteínas mutantes de canales iónicos. Por el contrario, varias realizaciones de la presente invención operan mediante la administración a células de un polinucleótido que codifica Tbx18, que permite la reprogramación directa de células somáticas a somáticas (por ejemplo, una célula no espaciadora se reprograma a una célula marcapasos o se reprograma una célula marcapasos defectuosa a una célula marcapasos funcional). De este modo, en varias realizaciones, las células marcapasos se generan sin la expresión de alteración inducida de las proteínas del canal iónico. Un aspecto adicional de la invención se define en las reivindicaciones.

50 Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1B representan la inmunohistoquímica de las células SAN de corazón de rata neonatal (1A) y adulta (1B). La SAN está demarcada por cotinción de HCN4 y separada de las aurículas circundantes. Barra de escala: 50 μm .

Las figuras 2A-2I representan los efectos de la transducción de Tbx18 en miocitos ventriculares de rata neonatal (NRVM). La figura 2A representa un aumento significativo en el número de cultivos de NRVM de latido espontáneo. Cada "n" representa un pocillo de una placa de 24 pocillos. La figura 2B muestra trazas de potencial de acción representativo (AP) de GFP- (2B a la izquierda) y Tbx18-NRVMs (2B a la derecha). La figura 2C representa el potencial diastólico máximo (izquierda), se resumen el índice de automaticidad (centro) y el número total de células (derecha) de los transitorios de Ca^{2+} espontáneamente oscilantes. La figura 2D representa las trazas de I_{K1} brutas a la izquierda y las densidades de I_{K1} resumidas a -140 mV a la derecha. La figura 2E representa la inmunotinción de HCN4 (HCN4-blanco, azul de núcleo) en GFP- (izquierda) o Tbx18-NRVMs (centro). Los datos resumidos se muestran a la derecha. La figura 2F (izquierda) representa que la transducción de Tbx18 conduce a un aumento de 3.8 veces en el número de NRVMs que expresan HCN4, mientras que 2F (derecha) representa un aumento de 1.4 veces en los niveles de proteína HCN4 en Tbx18-NRVMs. La figura 2G representa que las células transducidas con Tbx18 presentaron I_f a una densidad (-5.2 ± 1.3 pA/pF a -140 mV, $n = 3$) consistente con la informada en las células SAN de conejo. Las figuras 2H y 2I representan los cambios de los niveles relativos de ARNm de genes seleccionados que comparan Tbx18-NRVMs normalizados con GFP-NRVMs (izquierda) y SAN normalizados a LV (derecha). SAN y Tbx18-NRVMs demuestran un patrón similar de niveles de transcripción normalizados.

Las figuras 3A-3J representan los efectos de la expresión de Tbx18 en diversos aspectos de la señalización de calcio cardíaco en NRVMs. La figura 3A representa la obtención de imágenes confocales por escáner de línea de Tbx18-NRVMs resolviendo eventos de liberación de Ca^{2+} localizados (LCRs) precediendo a cada transitorio de Ca^{2+} de célula entera ($n = 8$ de 10 células), recapitulando la LCR observada en marcapasos SAN nativos. La figura 3B representa LCRs en células de control. Se observaron ocasionalmente chispas distribuidas al azar. La figura 3C representa que las LCRs tuvieron un periodo promedio del $72 \pm 1\%$ de la duración del ciclo. La figura 3D representa diagramas espacialmente promediados dF/F_0 de cambios en la concentración de Ca^{2+} que representan un aumento de 2.3 veces en los transitorios de Ca^{2+} inducidos por cafeína (20 mM) en los Tbx18-NRVMs en comparación con los controles. La figura 3E representa que los transitorios de Ca^{2+} espontáneos se suprimieron en $47 \pm 6\%$ en superfusión con el bloqueador RyR, rianodina (10 μ M) en Tbx18-NRVMs en comparación con solo $12 \pm 2\%$ de supresión en los controles. La figura 3F representa los experimentos de transferencia Western demostrando una disminución en los niveles totales de PLB y un aumento en PLB fosforilada (se16) similar a la SAN de rata adulta. La figura 3G indica que no se observaron cambios en los niveles de proteína de SERCA2A, NCX1 y RyR en los Tbx18-NRVMs en comparación con los controles. El nivel relativo de p-PLB (Ser16) fue 65 veces mayor en Tbx18-NRVMs en comparación con GFP-NRVMs (figura 3F, panel izquierdo), imitando el aumento de pPLN encontrado en la SAN en comparación con el del miocardio ventricular (figura 3F, panel derecho). Las diferencias en los niveles de proteína de SERCA2a, NCX1 y receptor de rianodina (RyR) no fueron detectables entre Tbx18 y GFP-NRVMs (figura 3G), lo que concuerda con los hallazgos en la SAN de conejo frente al ventrículo izquierdo. La figura 3H representa los datos relacionados con los niveles de cAMP intracelular en GFP-NRVMs (barras abiertas) y Tbx18-NRVMs (barras sombreadas). Los niveles intracelulares de cAMP fueron significativamente mayores en Tbx18-NRVMs en comparación con GFP-NRVMs, que imita el aumento que se sabe que existe entre la SAN de conejo en comparación con el miocardio ventricular. La figura 3I representa los datos relacionados con los transitorios de Ca^{2+} en los GFP- o Tbx18 NRVMs. La aplicación del inhibidor de PKA (PKI, 15 μ M) condujo al cese de los transitorios de Ca^{2+} de células enteras espontáneos en Tbx-NRVMs, pero no tuvo efecto sobre las GFP-NRVMs. La figura 3J indica que las LCRs de Tbx18-NRVMs son más largas y anchas que los eventos de liberación de Ca^{2+} espontáneos de GFP-NRVMs, medidos como ancho completo a la mitad de la duración máxima (FWHD, panel izquierdo) y de duración completa a la mitad del ancho máximo (FDHW, panel izquierdo) y las amplitudes de las señales de Ca^{2+} (medidas en unidades arbitrarias de F/F_0 , panel derecho) son similares entre los dos grupos.

Las figuras 4A-4C representan datos relacionados con la expresión de diversas proteínas cardíacas, función y expresión del canal después de la transducción de Tbx-18. La figura 4A representa SAN de rata neonatal, demarcadas por expresión de HCN4 (centro superior), que presentan expresión de α -actinina (α -SA) sarcomérica más débil y no estructurada (panel superior). Parte inferior izquierda: imagen de acercamiento del área en recuadro arriba a la izquierda. La figura 4B indica una reducción del 28% en el área de la célula y una reducción del 33% (izquierda y derecha, respectivamente) en la capacitancia de la membrana Tbx18-NRVMs en comparación con el control. La figura 4C: nivel de tri-metilación en H3K27 (izquierda) indica que Tbx18 aumentó la inactividad de los promotores Cx43, Kir2.1 y α -SA mientras que alivia su presión epigenética represiva sobre el promotor de HCN4 normalizado para controlar. Los niveles de H3K4me3 (derecha) indican que la relación de las regiones promotoras de HCN4 activas aumentó con la expresión de Tbx18 mientras que las regiones promotoras activas transcripcionalmente de Cx43, Kir2.1 y α -SA han disminuido con la expresión de Tbx18.

Las figuras 5A-5H representan investigaciones de genes y marcadores celulares característicos del corazón fetal. Los datos apoyan la reingeniería específica inducida por Tbx18 en lugar de la desdiferenciación a un estado embrionario/fetal. Las figuras 5A-5B representan la expresión del péptido natriurético auricular (ANP) en NRVM inducida por estimulación de 24 horas con endotelina-1 (100 nM). La expresión de ANP fue suprimida por la expresión de Tbx18 (B, panel inferior) mientras que GFP no tuvo efecto (A, panel inferior). La figura 5C representa la expresión de α -actina esquelética (α Ska) en Tbx18-NRVMs. La figura 5D representa la expresión de fosfohistona 3 (H3P, un marcador de células mitóticamente activo) y la incorporación de EdU (un análogo de BrdU, un marcador para mitosis y síntesis de ADN naciente) en GFP- y Tbx18-NRVMs ($n = 3$). Los datos inmunohistoquímicos se

- muestran en los paneles superiores y los datos de resumen en los paneles inferiores correspondientes. La expresión e incorporación de estos marcadores en Tbx18- y GFP-NRVMS es comparable, lo que respalda la conclusión de que los Tbx18-NRVMS no se desdiferenciaron a un estado embrionario/fetal. Las figuras 5E y 5G indican la existencia de diferencias globales menores entre Tbx18- y GFP-NRVMS en una comparación de la expresión de 84 genes relacionados con la remodelación de la cromatina. Las figuras 5F y 5H muestran una comparación similar entre las células iPS y sus fibroblastos originales.
- Las figuras 6A-6B representan datos relacionados con latidos ectópicos ventriculares. La figura 6A indica que la expresión focal de Tbx18 en el ápice de corazones de cobayas in vivo creó latidos ventriculares ectópicos (panel derecho) en comparación con GFP (panel izquierdo). La figura 6B indica que la tasa de latidos ventriculares ectópicos en animales inyectados con Tbx18 el día 3-5 después de la administración de genes es significativamente mayor que el control.
- Las figuras 7A - 7D indican que la expresión focal de Tbx18 (7A) en el ápice del corazón de cobaya in vivo crea ritmos ventriculares ectópicos (en comparación con los controles de GFP (7B)). Estos datos también están representados en trazas de EKG de animales TBX18 (7C) y controles de GFP (7D).
- La figura 8 representa un corazón de cobaya adulto inyectado con Tbx18 donde se aisló un solo miocito cinco días después de la inyección. Las células marcapasos SAN inducidas creadas mediante la reprogramación somática de Tbx18 (panel inferior derecho).
- Las figuras 9A-9G representan diversas características de los miocitos ventriculares transducidos con Tbx18 y de los miocitos ventriculares (VM) de GFP. La figura 9A representa una célula SAN (iSAN) inducida por Tbx18-transducida (célula positiva para GFP, fotografías superiores) frente a una célula nativa (parte inferior). La figura 9B representa miocitos de SAN en comparación con Tbx18-VMs y GFP-VMs. Los paneles superiores son imágenes de campo luminoso, mientras que los campos inferiores son imágenes fluorescentes. La inmunotinción contra α -SA reveló una estructura miofibrilar desorganizada en Tbx18-VMs similar a la de los miocitos de SAN nativos. La figura 9C representa imágenes de campo luminoso representativas de miocitos SAN vivos aislados recientemente, Tbx18-VM (informados por expresión de GFP) y GFP-VMs (paneles superiores) y miocitos fijados e inmunoteñidos (paneles inferiores). La figura 9D representa un análisis de la proporción entre la longitud y el ancho de los miocitos y la capacitancia de las células enteras como medidas de la forma y el tamaño de las células a partir de miocitos vivos recién aislados. Las Tbx18-VMs son de menor tamaño y tienen forma de huso comparadas con GFP-VMs ($n = 53$ para Tbx18-VMs y 80 para GFP-VMs y VMs no transducidas, $p < 0.01$), pero son similares a los miocitos de SAN nativos ($n = 24$). La figura 9E representa los potenciales de acción espontáneos registrados a partir de Tbx18-VMs individuales recién aisladas ($n = 5$, paneles centrales) usando una técnica de pinzamiento de corriente de parche perforado. Estos datos indican que Tbx18 muestra APs robustos y rítmicos con prominente despolarización diastólica, similar a los miocitos de SAN nativos (paneles izquierdos). Las mismas grabaciones se expanden en los paneles inferiores para mostrar la despolarización diastólica prominente en Tbx18-VMs y miocitos de SAN nativos. Los paneles de la derecha representan GFP-VMs que muestran un potencial de membrana en reposo estable y activan un solo potencial de acción solo con la estimulación eléctrica. La figura 9F indica que los parámetros de potencial de acción de Tbx18-VMs ($n = 5$) eran más cercanos a los miocitos de SAN nativos ($n = 6$) que a los GFP-VMs ($n = 6$). La figura 9G representa la relación longitud-ancho de Tbx18-VMs a 1 semana, 3 semanas y 6 semanas, en comparación con los miocitos de SAN nativos, GFP-VMs en 1 semana y un control sin virus.
- Las figuras 10A-10D representan datos relacionados con vástagos de las células transducidas con Tbx18. Las figuras 10A y 10B representan diagramas de dispersión para Tbx18-NRVMS frente a GFP-NRVMS e iPS frente a fibroblastos originales (Fibs), respectivamente. La gráfica de dispersión no representa cambios discernibles en los niveles de transcripciones relacionados con los vástagos en Tbx18-NRVMS en comparación con el control. Las figuras 10C y 10D representan un conjunto de RT-PCR de 84 transcritos de genes relacionados con la identificación, crecimiento y diferenciación de células madre.
- La figura 11A representa un esquema de las células derivadas del crecimiento de cuerpos embrioides (EB). La figura 11B representa un esquema para el crecimiento de EB del cuerpo embrioide (EB). El día 3, los EBs colgantes se cultivaron en suspensión. El día 6, los EBs se sembraron en placas de cultivo tisular.
- Las figuras 12A-12B representan la expresión endógena de Tbx18 (A) y Tbx3 (B) en relación con células madre embrionarias de murino de control (mESCs) durante el crecimiento de EBs.
- La figura 13A representa un programa de tratamiento de células con Shox2. El tratamiento con vectores que portan el gen Shox2 se produce en el día tres (en este esquema general), luego dos veces en el día 6. La figura 13B representa la expresión endógena de ARNm de Shox2 en diferentes momentos después de la transducción.
- La figura 14A representa el porcentaje de EBs de latido que se transdujeron con Shox2 con respecto a un control que se trató solo con GFP. La figura 14B representa el número de focos de latidos por EB de latido.

- La figura 15A representa el aumento en la expresión de ARNm de HCN4 para células tratadas con factores de expresión de Shox2 en relación con células tratadas con GFP. La figura 15B representa el análisis de transferencia de Western para los puntos de tiempo correspondientes en la figura 15A.
- 5 La figura 16 representa la coexpresión de HCN4 con troponina I en cardiomiocitos derivados de mESCs transducidos con Shox2 (B) en comparación con los controles de GFP (A).
- La figura 17 representa el ARNm de NCX1 (A) y los niveles de proteína (B) en células transducidas con Shox2 frente a un control de GFP en el día 6 + 7 (después de la transducción).
- La figura 18 representa el ARNm de NCX1 (A) y los niveles de proteína (B) en células transducidas con Shox2 frente a un control de GFP en el día 6 + 14 (después de la transducción).
- 10 La figura 19 representa el ARNm de Cx45 (A) y los niveles de proteína (B) en células transducidas por Shox2 frente a un control de GFP en el día 6 + 14 (después de la transducción).
- La figura 20 representa el ARNm de Cx43 (A) y los niveles de proteína (B) en células transducidas por Shox2 frente a un control de GFP en el día 6 + 14 (después de la transducción).
- 15 La figura 21A representa el cambio en el pliegue del ARNm de Cx43 en células transducidas por Shox2 frente a un control de GFP. La figura 21B representa el cambio de pliegue del ARNm de Cx45 en células transducidas por Shox2 frente a un control de GFP.
- La figura 22 representa la expresión de HCN4 y Cx45 en cardiomiocitos derivados de mESCs transducidos por Shox2.
- 20 La figura 23A representa que el ARNm de Shox2 endógeno de ratón está regulado positivamente con respecto a la transducción de cardiomiocitos derivados de ESC con Shox2 exógeno. La figura 23B muestra que el ARNm de Shox2 humano endógeno está regulado positivamente con respecto a la transducción de cardiomiocitos derivados de ESC con Shox2 exógeno.
- La figura 24A representa los niveles de ARNm de Tbx18 con respecto a la hidroximetilbilano sintasa (HMBS). La figura 24B muestra los niveles de ARNm de Tbx3 en relación con HMBS.
- 25 Las figuras 25A-25G indican la automaticidad de novo en respuesta a la regulación autonómica. La figura 25A representa el diseño de la matriz de múltiples electrodos de 6 pocillos (MEA, panel izquierdo) y una imagen representativa de los NRVMs cultivados como una monocapa en dicho pocillo.
- La figura 25B representa las tasas de activación promedio registradas a partir de los MEAs que demuestran una cronotropía de referencia significativamente más rápida en Tbx18-NRVMs en comparación con la del control. Las
- 30 tasas de activación de Tbx18-NRVMs aumentaron significativamente con la estimulación β -adrenérgica al cambiar los medios basales por uno que contenía isoproterenol 1 μ M (ISO). El desafío colinérgico posterior con acetilcolina (ACh) 1 μ M ralentizó significativamente las tasas de activación de Tbx18-NRVMs. Por el contrario, la cronotropía de GFP-NRVMs respondió poco a las entradas autonómicas. La figura 25C representa trazas en bruto representativas de un electrodo de un MEA de 6 pocillos sembrado en placas con Tbx18-NRVMs. La figura 25D representa la
- 35 inmunotinción en Tbx18-NRVMs (células GFP⁺), demostrando una expresión robusta de receptores β -adrenérgicos y receptores muscarínicos M². Las figuras 25E y 25F representan registros electrocardiográficos de un corazón perfundido intacto inyectado con Tbx18 en el ápice, in vivo. Como se analiza a continuación, se usan otros sitios de administración, dependiendo de la realización. Siete días después de la inyección, el corazón fue cosechado, perfundido y extraído por crioblación en la región de la unión AV. La polaridad y morfología de los latidos ectópicos
- 40 (figura 25E, panel izquierdo) es idéntica a la de los latidos estimulados por electrodos en el sitio de la inyección transgénica (figura 25E, panel derecho). Por el contrario, la mayoría de los corazones de control (7/10) mostraron un ritmo de escape de unión del QRS estrecho (figura 25F, panel izquierdo), que eran opuestos en polaridad y morfología a los de los latidos estimulados por electrodos en el ápice (figura 25F, panel derecho). La figura 25G indica la respuesta cronotrópica de corazones inyectados con Tbx18 a entradas autónomas, evaluadas cambiando
- 45 el perfundido (solución de Tyrode normal) a uno que contiene isoproterenol 1 μ M para la estimulación β -adrenérgica seguida por uno que contiene acetilcolina 1 μ M para la supresión colinérgica.
- Las figuras 26A-26C representan los resultados de la RT-PCR cuantitativa de una sola célula de las Tbx18-VMs a largo plazo. Los datos indican automaticidad persistente incluso después de que la expresión de Tbx18 haya disminuido. La figura 26A representa los miocitos ventriculares transducidos con Tbx18 ensayados tres días
- 50 después de la transferencia génica in vivo para validar la sensibilidad de la detección de transcritos de células individuales mediante RT-qPCR. Los datos indican que los niveles de transcripción de Tbx18 podrían detectarse de manera confiable en un amplio rango desde muy bajo (2.6% de GAPDH, célula 1) a muy alto (168% de GAPDH, célula 8).

- 5 La figura 26B representa los resultados de RT-qPCR de VMs recién aislados de las cobayas 6-8 semanas después de la transferencia génica in vivo inicial, lo que indica que los niveles de transcripción de Tbx18 en células de latido espontáneo eran ya sea pequeños (células 1 y 2) o insignificantes (células 3 y 4). Un Tbx18-Vm con una señal de GFP fuerte (célula 5) presentó una cantidad relativa mayor de Tbx18. La figura 26C representa un control negativo (los VMs que expresan GFP solo se analizaron para Tbx18).
- Las figuras 27A y 27B representan secciones histológicas de un corazón de cobaya inyectado con Tbx18, indicando una transducción fuerte y focal de Tbx18 en la región de inyección.
- 10 Las figuras 28A y 28B representan la colocación de los electrodos para registros de ECG de corazón completo intactos ex vivo. El corazón fue retrógrado-perfundido a través de la aorta a 60 mmHg con solución de Tyrode oxigenada a 36 °C. El corazón perfundido se colocó en un plato recubierto de Sylgard lleno de solución de Tyrode caliente. Los electrodos del ECG se colocaron en sitios apropiados para hacer el registro de los electrodos I y II.
- 15 Las figuras 29A-29C representan los electrocardiogramas de corazones inyectados con Tbx18 de tres a cuatro semanas después de la transferencia del gen. La figura 29A indica un ritmo idioventricular ectópico a 165±14 bpm (n = 3/3). La figura 29B representa electrocardiogramas lo que concuerda con el ritmo biológico del sitio de inyección de Tbx18. La figura 29C indica que los corazones respondieron a la regulación autonómica de una manera similar a los corazones inyectados con Tbx18 a corto plazo (figura 25G).
- 20 Las figuras 30A y 30B representan los resultados de la PCR en tiempo real para examinar los niveles de ARNm de Tbx18 en miocitos individuales. Las curvas estándar para cada uno de los 3 conjuntos de cebadores se construyeron con diluciones seriadas de plantillas de ADN de entrada y eficacias de amplificación comparables validadas (pendientes de la curva: -3.32 a -3.64). Los niveles relativos de ARNm de Tbx18 humano, GAPDH de cobaya y TnnT2 de cobaya se obtuvieron mediante la extrapolación de los valores de Ct con las pendientes de la curva estándar para cada conjunto de cebadores. La cantidad de ARNm de Tbx18 en cada célula se normalizó entonces a nivel de GAPDH o TnnT2.
- Descripción detallada
- 25 Antecedentes
- Anormalidades del tejido excitable
- 30 Las arritmias cardíacas pertenecen a un grupo heterogéneo de afecciones en las que existe una actividad eléctrica anormal en el corazón. Como resultado de una arritmia, la frecuencia cardíaca puede ser demasiado rápida, demasiado lenta y/o regular o irregular. La actividad eléctrica normal en el corazón es el resultado de un impulso eléctrico que se origina en la aurícula derecha del corazón, en particular el nodo sinusal (también denominado nodo sinoauricular, nodo SA y/o SAN). Este impulso induce la contracción de ambas aurículas. El impulso luego pasa a través del nódulo auriculoventricular (o AV) y a través de ambos ventrículos a través de las fibras de haz de His y Purkinje. El resultado es una contracción sincronizada del músculo cardíaco, y de este modo, flujo sanguíneo. Las frecuencias cardíacas adultas normales oscilan entre 60 y 80 latidos por minuto, mientras que la frecuencia cardíaca en reposo en los niños suele ser mucho más rápida.
- 35 Las bradicardias (HR de <60 bpm) tienen múltiples etiologías posibles, a saber, señales ralentizadas del nodo sinusal (bradicardia sinusal), pausas en la actividad normal del nodo sinusal (paro sinusal), o bloqueos del impulso eléctrico de la aurícula a los ventrículos (bloqueo AV). Las taquicardias (HR en reposo de > 100 bpm) pueden causar meras palpitaciones (un sujeto se vuelve anormalmente consciente de su ritmo cardíaco) y pueden ser simplemente el resultado de la estimulación simpática del sistema nervioso central del nodo sinusal (conocida como taquicardia sinusal), por ejemplo, durante el ejercicio o estrés físico. La taquicardia que no es una taquicardia sinusal puede ser el resultado de impulsos anormales además del ciclo cardíaco normal. Los impulsos anormales pueden comenzar por uno de tres mecanismos: automaticidad, reentrada o actividad desencadenada.
- 40 Ciertos tejidos cardíacos son capaces de iniciar un impulso eléctrico por sí mismos, que se conoce como automaticidad. Normalmente, tales células automáticas están ubicadas en el sistema de conducción del corazón (nodo SA, nodo AV, paquete de fibras de haz de His y de Purkinje). El nódulo sinoauricular es una única ubicación especializada en la aurícula que tiene una automaticidad más alta (un marcapasos más rápido) que el resto del corazón, y, por lo tanto, habitualmente es responsable de establecer la frecuencia cardíaca e iniciar cada latido cardíaco.
- 45 Las arritmias de reingreso se producen cuando un impulso eléctrico circula de forma recurrente a través de una región pequeña del corazón, en lugar de propagarse desde las aurículas a los ventrículos. Si la conducción es anormalmente lenta en algunas áreas del corazón, por ejemplo, debido a tejido cardíaco dañado o enfermo, los tiempos de propagación de los impulsos variarán, y ciertos impulsos pueden potencialmente tratarse como un impulso completamente nuevo. Tal propagación de impulsos inconexos puede producir ritmos de circuito anormales sostenidos, que son responsables del aleteo auricular, la mayoría de las taquicardias supraventriculares paroxísticas y la taquicardia ventricular peligrosa.
- 50
- 55

5 Cuando una cámara completa del corazón tiene múltiples circuitos de reentrada, se considera que la cámara está en fibrilación y se estremece debido a la estimulación eléctrica caótica, en lugar de contraerse y administrarse sangre suavemente. La falta de sangre suave y sostenida y la contracción caótica pueden provocar shock cardiogénico, interrupción de la circulación sanguínea eficaz y muerte súbita cardíaca. La fibrilación puede afectar la aurícula (fibrilación auricular) o el ventrículo (fibrilación ventricular); la fibrilación ventricular es inminentemente mortal.

Tratamientos convencionales para anomalías de tejido excitable

10 Los tratamientos de arritmia tradicionales incluyen terapia farmacológica, marcapasos electrónicos, desfibriladores cardioversores implantables (ICDs), ablación y combinaciones de los mismos. Si bien estos tratamientos tradicionales se han usado en el pasado para tratar diversos tipos de arritmias cardíacas, estos enfoques tienen varias deficiencias. Los marcapasos implantados y los ICDs pueden causar complicaciones a causa de la implantación del dispositivo, el mal funcionamiento o la infección del hardware. Las terapias farmacológicas pueden no tolerarse bien en algunos pacientes y tienen la capacidad de inducir arritmias adicionales durante el tratamiento. De este modo, existe una necesidad de alternativas o suplementos a terapias farmacológicas y dispositivos implantables para modular la contractilidad y/o la conductancia cardíaca.

15 Existen diversos enfoques para la generación de marcapasos biológicos que son distintos de los descritos en este documento, ya que varios de tales métodos emplean la administración de canales iónicos, o subunidades de canales iónicos a células cardíacas. En particular, se han investigado los canales de iones negativos dominantes (o subunidades del mismo). En general, como resultado de la expresión de un canal de iones negativo dominante en las células cardíacas, se altera la corriente iónica a través de la membrana celular, lo que da como resultado una activación de tipo marcapasos en estas células. Tales métodos por lo general se basan en la entrega de genes que manipulan eficazmente la función de las células tratadas al alterar la capacidad de la célula con respecto a la conducción de ciertos iones. En otras palabras, tales enfoques por lo general toman la célula existente, y aumentan o alteran sus estructuras existentes (por ejemplo, canales iónicos) para cambiar su función.

25 En contraste, varias realizaciones de la invención dan como resultado células quiescentes que se reprograman para convertirse en células biológicas de marcapasos. Varias realizaciones de la invención son particularmente ventajosas debido a que la reprogramación de células en reposo convierte las células a su estado natural, en lugar de tratar células con secuencias genéticas que no existían naturalmente en la composición celular. Por ejemplo, varias realizaciones son ventajosas porque la reprogramación de las células quiescentes con Tbx8 o fragmentos funcionales de las mismas capaces de convertir células quiescentes o células madre en células marcapasos (por ejemplo, no con canales iónicos) reduce el riesgo de anomalías inducidas en la célula reprogramada. En algunas realizaciones, los factores de transcripción son menos voluminosos (por ejemplo, se pueden usar secuencias genéticas más pequeñas) lo que reduce las complicaciones logísticas y abre opciones de administración adicionales. Algunas realizaciones de la invención son particularmente beneficiosas porque, al convertir una célula en un estado de marcapasos natural (o nativo), esa célula tendrá una mayor probabilidad de éxito en generar y mantener un ritmo de marcapasos apropiado con posibilidades reducidas de efectos secundarios que pueden ocurrir con otros enfoques (por ejemplo, inducción de arritmias debido al tratamiento en sí mismo). Además, varias realizaciones de la invención son beneficiosas porque reducen la necesidad de "ajustar" el efecto deseado (por ejemplo, requerir una dosis o número de tratamientos mayor para lograr un resultado particular) como la conversión de las células a un estado de marcapasos natural permite que las células operen a frecuencias naturalmente definidas y, por lo tanto, equilibradas. Como resultado, varias realizaciones de los métodos requieren menos administraciones (o dosis) de las composiciones con el fin de lograr la conversión de un número suficiente de células para generar un nuevo marcapasos en el corazón. De este modo, en varias realizaciones, los métodos descritos en este documento pueden ser menos invasivos para un paciente, requiriendo menos procedimientos de administración, con lo que presentan menos riesgos para el paciente y disminuyen la morbilidad debido a la terapia en sí misma.

45 Además, varias realizaciones de los métodos descritos en este documento son ventajosas porque no dependen de la modificación (por secuencias "no nativas") de unidades funcionales complejas existentes de células cardíacas (por ejemplo, los canales iónicos), más bien, la conversión de las células a un estado de marcapasos da como resultado la generación de un complemento completo de canales de marcapasos endógenos funcionales. El requerimiento reducido de modificación de los canales existentes reduce la probabilidad de que se produzcan resultados adversos (por ejemplo, formación errónea de canales o formación de canales que producen un mayor o menor impacto en la función de lo previsto).

55 Adicionalmente, varias realizaciones reducen ventajosamente el riesgo de efectos secundarios no deseados debido a la actividad eléctrica desequilibrada en las células, ya que las células convertidas en marcapasos mediante los métodos de la presente invención tienen un complemento completo y funcionalmente equilibrado de corrientes iónicas (y por lo tanto actividad eléctrica), en lugar de que las células hayan tenido una sola corriente que haya sido manipulada exógenamente.

60 Como se describe en este documento, la administración de factores de transcripción implicados en el desarrollo natural temprano de células marcapasos (cuya expresión se reduce después de que se completa el desarrollo) puede reprogramar inesperadamente células que no son marcapasos en células marcapasos. Estos enfoques son

inesperados porque la visión general de las células cardíacas es que están diferenciadas terminalmente (por ejemplo, una vez que una célula contráctil, siempre una célula contráctil). Sin embargo, varias realizaciones de los presentes métodos permiten la reprogramación de estas células, sin alteración exógena directa de sus canales iónicos. De este modo, en lugar de manipular las unidades funcionales (canales iónicos) de las células que no son

5 marcapasos, varias realizaciones de los métodos descritos en este documento cambian el destino funcional y la identidad funcional de las células en las células marcapasos. Como tal, varias realizaciones de los métodos y composiciones descritos en este documento dan como resultado la generación de un marcapasos biológico reprogramado, que disminuye u obvia la necesidad de tales terapias farmacológicas tradicionales, ablación o marcapasos artificiales.

10 Factores de transcripción para generar marcapasos biológicos

El uso de marcapasos biológicos basados en factores de transcripción reduce y/u obvia la necesidad de terapias de arritmia tradicionales. En varias realizaciones, la generación de un marcapasos biológico se usa para complementar las terapias tradicionales para bradicardias u otras arritmias. En varias realizaciones, la generación de un marcapasos biológico reduce la dependencia (por ejemplo, los pacientes se apartan gradualmente) de las terapias

15 tradicionales. En varias realizaciones, las arritmias cardíacas se tratan generando un marcapasos biológico que impulsa el corazón a un ritmo normal o sustancialmente normal que no era posible cuando un sujeto no se trataba o cuando se trataba con una terapia no biológica (por ejemplo, terapia de marcapasos electrónica o farmacéutica) En varias realizaciones, la generación de un marcapasos biológico se usa como una terapia puente (por ejemplo, para pacientes con daño cardíaco suficiente para necesitar un trasplante).

20 En varias realizaciones, la generación de un marcapasos biológico comprende inducir la conversión de células cardíacas quiescentes en células marcapasos mediante la transferencia de Tbx8 o fragmentos funcionales de los mismos capaces de convertir células quiescentes o células madre en células marcapasos (puede producirse una transferencia, por ejemplo, mediante el uso de técnicas de administración de genes usadas para administrar polinucleótidos que codifican uno o más de Tbx8 o fragmentos funcionales del mismo capaces de

25 convertir células quiescentes o células madre en células marcapasos). Como se usa en este documento, el término "células cardíacas quiescentes" tendrá su significado ordinario y también se referirá a células cardíacas que presentan ninguna, poca o una tasa de activación inapropiada y/o las células cardíacas no son espontáneamente activas. Se apreciará que la identificación de células cardíacas quiescentes depende, en algunos casos, del tipo de célula al que se dirige. Por ejemplo, el miocardio ventricular y/o auricular normalmente responde a las señales eléctricas generadas por las células marcapasos y, de este modo, por lo general tiene tasas de activación

30 espontánea más bajas en comparación con las células marcapasos normales. De este modo, si se dirigen a las células quiescentes ventriculares y/o auriculares del miocardio que tienen poca tasa de activación, en algunos casos, las células tienen menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 15% o menos de aproximadamente 10% de la activación espontánea en comparación con células marcapasos normales. Alternativamente, ciertos aspectos descritos en este documento se dirigen a una región (o regiones) que no funciona bien del sistema de conducción del corazón. Por ejemplo, en varios casos se dirige una región que no funcionan bien del nodo sinoauricular, por ejemplo, en el síndrome del seno enfermo. En casos adicionales, el nódulo auriculoventricular (AV) está dirigido, por ejemplo, en pacientes que tienen bloqueo AV. En casos aún adicionales, las rutas de conducción secundarias del corazón (por ejemplo, el sistema His-Purkinje y/o el haz DE His) están

40 dirigidas. En tales tejidos que normalmente presentan actividad eléctrica repetitiva espontánea, las células quiescentes son aquellas que activan a un ritmo reducido en comparación con una célula normal en esa región del corazón, siendo dicha tasa reducida insuficiente para mantener una tasa de activación cardíaca y/o salida cardíaca apropiada. De este modo, las células quiescentes, en algunos casos, se reconocen como aquellas células que, si son responsables de controlar la actividad eléctrica del corazón, lo harían a un nivel de activación eléctrica que es

45 insuficiente para mantener un flujo sanguíneo apropiado en todo el sistema cardiovascular (por ejemplo, aquellas células que activan a una tasa hemodinámicamente no sostenible).

Se describe en este documento la generación de un marcapasos biológico a partir de la administración de factores de transcripción a tejido cardíaco in vivo, dando como resultado la conversión de cardiomiocitos quiescentes, células madre cardíacas endógenas, o combinaciones de las mismas, a células marcapasos. En algunos casos, la

50 generación de un marcapasos biológico se realiza mediante la administración de factores de transcripción in vitro que da como resultado la conversión de células somáticas cultivadas, cardiomiocitos, células madre (incluidas células madre embrionarias, pluripotentes inducidas, pluripotentes, multipotentes, unipotentes y/o adultas), o combinaciones de las mismas a las células marcapasos. En varios casos, estas células marcapasos generadas se pueden implantar posteriormente in vivo para tratar anomalías del ritmo cardíaco.

55 Se describe en este documento también la conversión de células somáticas, cardiomiocitos y/o células madre en células marcapasos usando factores de transcripción que son reguladores del desarrollo del nodo sinoauricular embrionario (SAN). Los factores de transcripción potenciales que regulan el desarrollo embrionario de SAN incluyen, pero no están limitados a: Tbx18, Shox2, Tbx3 y/o Tbx5. Tbx18 es un factor de transcripción que se requiere para el desarrollo embrionario del área de la cabeza de la SAN, pero, como se analiza con más detalle a continuación, por lo general no se detecta por nacimiento y permanece indetectable en la edad adulta (figura 1). Shox2 es un

60 regulador negativo de Nkx2.5 en el seno venoso. Esta proteína es crítica para la diferenciación de tejidos. Además,

los embriones de ratón y pez cebra deficientes en Shox2 muestran bradicardia. Tbx3 es un potente regulador de la especialización SAN, con errores de desarrollo resultantes de ya sea deficiencia o expresión ectópica. Tbx5, que muestra una correlación inversa entre su dosificación y la morfogénesis cardíaca anormal en el síndrome de Holt-Oram, es un regulador positivo de Shox2 y Tbx3.

5 Como se describió anteriormente, varios aspectos de la generación de marcapasos biológico se basan en la terapia in vivo. En varios casos, Shox2, Tbx18 o combinaciones de los mismos se administran in vivo para inducir actividad de marcapasos ectópico en células somáticas no marcapasos, cardiomiocitos, células madre endógenas o combinaciones de las tres. En varios casos, otras combinaciones de factores de transcripción que regulan SAN (o factores de transcripción que se relacionan con el desarrollo cardíaco, pero no específicamente la regulación de SAN) se pueden usar con o sin Shox2 y Tbx18, o Shox2 y Tbx18 individualmente para convertir células in vivo a células marcapasos. Esos otros factores de transcripción incluyen, pero no están limitados a Tbx3 y Tbx5. Las secuencias para Tbx3, Tbx5, Tbx18, Shox2 y sus variantes se muestran en el apéndice A, B, C y D, respectivamente.

15 En varios casos, Tbx18, Shox2 o una combinación de Tbx-18 y Shox2 se administran a cardiomiocitos o células madre in vitro, lo que, como se analiza a continuación, produce células marcapasos cultivadas. Estas células se pueden administrar posteriormente a pacientes como una terapia celular para generaciones de marcapasos biológicos. En varios casos, la administración comprende la administración directa de las células al corazón de un sujeto (por ejemplo, inyección). Otras rutas de administración se describen en este documento. Por ejemplo, en algunos casos, se emplea administración basada en catéter. En otros casos, las células marcapasos generadas se incorporan a una matriz, injerto u otro biomaterial que ayuda a la retención celular en un sitio diana dentro del corazón. Las células usadas para la generación in vitro de marcapasos biológicos, en algunos casos, se recogen del tejido sano del paciente en el que se van a trasplantar (por ejemplo, un trasplante autólogo de células marcapasos inducidas). Entonces estas células se pueden convertir en células marcapasos por factores de transcripción in vitro y se pueden reinsertar en el mismo paciente para el tratamiento de arritmias. En otros casos, se realiza un trasplante alogénico de células marcapasos inducidas (por ejemplo, las células se recogen de un primer sujeto, se cultivan in vitro, se ponen en contacto con uno o más de los factores de transcripción descritos en este documento y luego se trasplantan a un segundo sujeto). En varios casos, se usan otros factores de transcripción que regulan SAN o combinaciones de tales factores de transcripción (por ejemplo, factores de transcripción además o en lugar de Tbx18, Shox2 y/o Tbx-18 + Shox2) para convertir células in vitro en células marcapasos. Esos otros factores de transcripción incluyen, pero no están limitados a Tbx3 y Tbx5.

Los pacientes que tienen anomalías de tejido excitable que se pueden tratar con los métodos descritos en este documento incluyen mamíferos y en particular humanos. Los pacientes incluyen aquellos que padecen o han sido diagnosticados con una o más de las afecciones cardíacas descritas en este documento u otras afecciones conocidas en la técnica que afectan la actividad cardíaca, la conductividad, el ritmo y similares.

35 Vectores de entrega de genes

En este documento se describe la reprogramación de cardiomiocitos realizada usando la entrega de genes como un medio para administrar material genético exógeno a células somáticas, cardiomiocitos, células madre, o combinaciones de las mismas. En varios aspectos, los polinucleótidos se administran en un sistema de administración de ácido nucleico. En varios aspectos, un sistema de administración de ácido nucleico comprende un vector no viral unido al polinucleótido. Los ejemplos de tales vectores no virales incluyen el polinucleótido solo (por ejemplo, ADN desnudo) o el polinucleótido en combinación con una formulación apropiada de proteína, polisacárido o lípido.

45 En varios aspectos, los sistemas de administración de ácido nucleico comprenden uno o más vectores virales, que incluyen, pero no se limitan a, adenovirus, virus asociado a adenovirus (AAV), adenovirus dependiente de auxiliares, lentivirus, retrovirus o virus hemaglutinante de complejo Japón-liposoma. (HVJ). Diversos serotipos de adenovirus y/o AAV también se usan en varios aspectos. En varios aspectos, el vector viral comprende un promotor eucariótico. En varios aspectos, se usan promotores de citomegalovirus (CMV). Otros promotores, incluyendo promotores específicos de tejido están bien establecidos en la técnica y se pueden usar en ciertos casos. Los vectores adicionales incluyen vectores retrovirales tales como virus de la leucemia de murino de Moloney y virus basados en HIV. En un caso, un vector viral basado en HIV comprende al menos dos vectores en los que los genes gag y pol son de un genoma de HIV y el gen env es de otro virus. Los vectores virales de ADN se usan en algunos casos, que incluyen, pero no se limitan a, vectores pox tales como vectores de ortopox o avipox, vectores del herpes tales como un vector de virus del herpes simple I (HSV).

55 En varios aspectos, los polinucleótidos (por ejemplo, los que codifican uno o más factores de transcripción) se administran in vivo y/o in vitro para convertir las células (tallo, cardiomiocitos y/u otras células somáticas) en células marcapasos. En algunos casos, los polinucleótidos que codifican un fragmento funcional del factor de transcripción se administran además o en lugar de todo el factor de transcripción. Como se usa en este documento, los términos "fragmento", "fragmento funcional" o términos similares recibirán su significado ordinario y se referirán a una porción de una secuencia de aminoácidos (o polinucleótido que codifica esa secuencia) que tiene al menos aproximadamente 70%, preferiblemente al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente al menos

aproximadamente 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de la función de la correspondiente secuencia de aminoácidos de longitud completa (o polinucleótido que codifica esa secuencia). Los métodos para detectar y cuantificar la funcionalidad de tales fragmentos se establecen en la técnica.

Métodos de administración

5 En varios aspectos, la administración de las composiciones (que son factores de transcripción o células) descritas en este documento para modular la actividad eléctrica cardíaca es a través de inyección cardíaca directa (por ejemplo, durante la implantación o explantación de marcapasos electrónico). En algunos casos, se usa inyección sistémica. La inyección intracoronaria se usa en algunos casos. En aun casos adicionales, se usa administración dirigida por catéter. En algunos casos, se usa un sistema de catéter guiado por un mapa (por ejemplo, NOGA®), para
 10 administrar focalmente las composiciones. En algunos casos, se usan otras técnicas de mapeo o guía. Por ejemplo, en varias realizaciones se usa orientación basada en fluoroscopia. La guía electroanatómica también se usa en algunos casos. El mapeo de estructuras específicas (que incluyen, pero no se limitan a haz de His, las porciones derecha o izquierda del haz, las fibras de Purkinje, etc.) mediante electrogramas intracardíacos también se usan en algunos casos. Además, también se usan rayos X o catéteres magnéticos en algunos casos para guiar la entrega de
 15 un catéter, aguja u otro (s) dispositivo (s) de administración a una ubicación diana deseada.

En varios aspectos, un enfoque de administración focal reduce de manera ventajosa el tiempo hasta la generación de un marcapasos biológico activo. En algunos casos, la administración específica de tejido (o específica de tipo de célula) de varias de las construcciones descritas en este documento es ventajosa porque la construcción es particularmente apropiada para facilitar la generación de un marcapasos biológico basado en el perfil de expresión
 20 de tejidos endógenos. En algunos casos, las combinaciones de factores de transcripción se administran al mismo sitio diana, mientras que, en otros casos, las construcciones individuales se administran a sitios diana distintos, con el efecto general que resulta en la generación de marcapasos biológicos.

En varios aspectos, la transducción se logra mediante inyección focal en el ápice del corazón. En varios casos, la transducción se logra mediante inyección focal en el ápice del ventrículo izquierdo. En varios casos, se utiliza un enfoque del lado derecho (por ejemplo, el lado derecho del corazón, ya sea en la aurícula o el ventrículo), para reducir el riesgo de accidente cerebrovascular u otra embolia. Sin embargo, en varios casos, se usan enfoques del lado izquierdo. En varios casos, se introduce un catéter de inyección a través de la aurícula derecha (en lugar del ventrículo derecho), para acceder al haz de His o nodo AV desde arriba. En varios casos, los métodos de catéter transeptal se usan para introducir un catéter de inyección en la aurícula izquierda o el ventrículo izquierdo sin la
 25 necesidad de acceso arterial, lo que reduce el riesgo de accidente cerebrovascular. En casos adicionales, la introducción de un catéter de inyección se realiza a través de las venas cardíacas a través del seno de Valsalva para la inyección de un agente biológico como se describe en este documento en diversos objetivos de los ventrículos. Dicho enfoque es similar al usado para la colocación de marcapasos en la terapia de resincronización cardíaca.

De este modo, en varios aspectos, las composiciones como se describen en este documento se pueden usar para administrar uno o más factores de transcripción (o células que han sido contactadas previamente con los factores de transcripción) a cualquiera la aurícula derecha, el ventrículo derecho, el nodo SA, el nodo de AV, haz de his, y/o ramas del haz izquierdo y derecho. Además, a través de la canulación del seno coronario y sus ramas venosas, se logra la administración a múltiples sitios del ventrículo izquierdo en varios casos. Ventajosamente, en aquellos
 35 pacientes con anatomía venosa coronaria desfavorable, el acceso al lado izquierdo se logra, en varios casos, desde el lado derecho a través de una punción transeptal que permite el acceso directo a las estructuras del lado izquierdo sin necesidad de acceso arterial.

Los métodos suplementarios se usan en varios casos e incluyen la administración de compuestos para aumentar la permeabilidad microvascular del tejido cardíaco. Agentes de permeabilidad vascular apropiados (administrados antes, durante o después de la administración de un vector de transferencia génica) incluyen una solución que tiene
 45 menos de aproximadamente 500 micromolar de calcio: sustancia P, histamina, acetilcolina, un nucleótido de adenosina, ácido araquidónico, bradiquinina, endotelina, endotoxina., interleucina-2, nitroglicerina, óxido nítrico, nitroprusiato, un leucotrieno, un radical de oxígeno, fosfolipasa, factor activador de plaquetas, protamina, serotonina, factor de necrosis tumoral, factor de crecimiento endotelial vascular, un veneno, una amina vasoactiva o un inhibidor de sintasa de óxido nítrico, serotonina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o un fragmento funcional de
 50 VEGF.

Efecto del marcapasos biológico en los tejidos

En varios aspectos, la administración de factores de transcripción (o células en contacto con esos factores de transcripción in vitro) descritos en este documento induce o provoca de otro modo que las señales eléctricas repetitivas espontáneas se generen en células que respondieron previamente a tales señales, pero no las generaron. Por ejemplo, para células de miocardio tratadas que presentaron poco (por ejemplo, un índice de automaticidad entre aproximadamente 40% a aproximadamente 30%, aproximadamente 30% a aproximadamente 20%, aproximadamente 20% a aproximadamente 10%, o aproximadamente 10% a aproximadamente 0%, o rangos de solapamiento del mismo) o sin tasa de activación, presentan una frecuencia incrementada de tasa de activación o salida de señal eléctrica post-administración (por ejemplo, un índice de automaticidad de entre aproximadamente 5%

5 a aproximadamente 15%, aproximadamente 15% a aproximadamente 25%, aproximadamente 25% a aproximadamente 35%, aproximadamente 35% a aproximadamente 45%, aproximadamente 45% a aproximadamente 55%, aproximadamente 55% a aproximadamente 65%, aproximadamente 65% a aproximadamente 75%, aproximadamente 75% a aproximadamente 85%, aproximadamente 85% a aproximadamente 95%, aproximadamente 95% a aproximadamente 100%, o más) en comparación con la administración previa de las células.

10 Los cambios resultantes en la contracción cardíaca y/o una propiedad eléctrica de las células marcapasos convertidas, mediante los métodos descritos en este documento, modulan el ritmo cardíaco en varios aspectos. En varios casos, los métodos y composiciones descritos en este documento logran una frecuencia cardíaca dentro de aproximadamente 25%, dentro de aproximadamente 20%, dentro de aproximadamente 15%, dentro de aproximadamente 10%, dentro de aproximadamente 5%, dentro de aproximadamente 2%, o dentro de aproximadamente 1% de una frecuencia cardíaca clínicamente deseada. En varios casos, los métodos y composiciones descritos en este documento se usan para tratar sujetos que padecen o son susceptibles a una enfermedad o trastorno tal como un síncope relacionado con el corazón (por ejemplo, síncope de Stokes-Adam), una anomalía de la función del nodo sinusal tal como bradicardia de seno persistente, bloqueo sinoauricular (S-A) que se manifiesta como SA Wenckebach, bloqueo S-A completo o paro sinusal y bloqueo auriculoventricular de alto grado; o síndrome de taquicardia-bradicardia u otra condición relacionada con la bradicardia. En varios casos, la modulación se usa para aumentar o ralentizar la función de un marcapasos implantado (por ejemplo, para lograr una frecuencia cardíaca deseada que el marcapasos implantado no puede proporcionar por sí mismo).

20 Cambios en las células como resultado de la administración de factores de transcripción

25 La administración de Tbx18, Shox2, o una combinación de los mismos produce varios cambios fisiológicos a las células contactadas además de o separadas de la generación de señales eléctricas repetitivas espontáneas discutidas anteriormente. En algunos casos, estos cambios fisiológicos incluso si se observan por primera vez in vitro, también son detectables in vivo, donde pueden servir como marcadores complementarios de la eficacia de la generación de marcapasos biológico (por ejemplo, se reconocen como características o marcas distintivas de células marcapasos). En algunos casos, la administración de uno o más factores de transcripción da como resultado un porcentaje aumentado de cultivos de monocapa de latido espontáneo en comparación con el control. En varios casos, la presencia, o cantidad, de latidos espontáneos se usa para cribar cultivos para la funcionalidad antes del trasplante o para evaluar otras combinaciones de factores de transcripción para su utilidad en la generación de células marcapasos in vitro. En algunos casos, la administración de uno o más factores de transcripción da como resultado oscilaciones intracelulares espontáneas de Ca^{2+} de las células del miocardio administradas. En algunos casos, la administración de uno o más factores de transcripción da como resultado una despolarización progresiva de la fase 4. En algunos casos, la administración de uno o más factores de transcripción descritos en este documento aumenta o disminuye la expresión de HCN4 en las células. Debido a que el flujo de calcio es un componente primario de la señalización eléctrica cardíaca y la expresión de HCN4 es importante en la función de la célula marcapaso, los cambios en estos puntos finales corresponden, en algunos casos, a un comportamiento similar a SAN en las células inducidas por marcapasos biológicos. En algunos casos, la administración de uno o más factores de transcripción da como resultado la modulación de eventos de liberación de Ca^{2+} localizados espontáneamente, subsarcolemal. En algunos casos, la administración de uno o más factores de transcripción da como resultado la modulación de los niveles de cAMP intracelulares. De este modo, como resultado de la administración de uno o más de los tipos de factores de transcripción anteriores, la actividad eléctrica cardíaca se puede modular y se pueden tratar anomalías en el tejido cardíaco excitable.

45 En varios casos, la administración de Tbx18, Shox2 o una combinación de los mismos dará como resultado células de nuevos fenotipos de las células contactadas además de o separadas de la generación de señales eléctricas repetitivas espontáneas. En algunos casos, la administración de uno o más factores de transcripción da como resultado una expresión de α -actina sarcomérica desorganizada y marcadamente inferior en células transducidas, lo que es indicativo de células marcapasos. En algunos casos, la administración de uno o más factores de transcripción da como resultado un cambio en el tamaño de la célula. En algunos casos, la administración de uno o más factores de transcripción da como resultado cambios en el estado de la cromatina. En algunos casos, la administración de uno o más factores de transcripción da como resultado la modificación de la cromatina y provocará una expresión y/o actividad menor o mayor de uno o más de los siguientes genes: Cx43, Kir2.1, Actc2 y HCN4. Estos cambios fenotípicos, reflejan los de las células SAN naturales y, como resultado de la administración de uno o más de estos factores de transcripción, se pueden usar, en varios casos, como un medio adicional para evaluar la generación de células marcapasos biológicos.

55 En varios casos, la administración de uno o más factores de transcripción al corazón dará como resultado latidos ventriculares ectópicos frecuentes que se originan en el sitio de la inyección génica que da como resultado la generación específica de actividad de marcapasos. En algunos casos, la administración de uno o más factores de transcripción da como resultado cambios epigenéticos relacionados con genes en las células y la actividad de marcapasos de novo. Esta actividad de marcapasos, en algunos casos, es el resultado de la reprogramación somática y no debido a la desdiferenciación a un estado progenitor. La transdiferenciación somática a somática reducirá la amenaza de neoplasia de las células transducidas (por ejemplo, se reduce la formación de teratoma). En

otros casos, sin embargo, la administración de uno o más factores de transcripción puede dar como resultado la desdiferenciación a un estado progenitor. En ciertos casos, la diferenciación en células marcapasos se induce usando uno o más de los factores de transcripción descritos en este documento. Usando tales métodos, las células marcapasos biológicos se pueden fabricar de forma segura y eficaz a partir de una amplia variedad de células.

5 Ejemplos

Los ejemplos proporcionados a continuación están destinados a ser realizaciones no limitativas de la invención.

Métodos:

Transducción heteróloga de NRVMs

10 El gen Tbx18 humano con una etiqueta myc/FLAG C-terminal se escindió de pCMV6-Tbx18 (Origene, Rockville, MD) por digestión con FseI y Sall. El gen Tbx18 luego se subclonó en un vector de expresión lentiviral digerido con NotI y XhoI con el gen indicador deseado, pLVX-IRES-ZsGreen1 (Clontech, Mountain View, CA), generando de este modo el vector pLV-Tbx18-IRES-ZsGreen1 (-10.1 kb). ZsGreen1 se usó como la proteína indicadora para cardiomiocitos transducidos con Tbx18, debido a sus características espectrales similares a las GFP usadas comúnmente. De este modo, a lo largo de la divulgación, los términos ZsGreen1 y GFP se usan indistintamente. El gen diana recombinante se introdujo luego en un esqueleto del vector de adenovirus mediante clonación de recombinación de Gateway usando vectores adaptados a Gateway (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se realizó una reacción de recombinación de LR entre el clon de entrada y el vector de destino, pAd/CMV/V5-DEST (-36,7 kb), para generar la construcción de expresión adenoviral deseado, pAd-CMV-TBX18-IRES-GFP (-39,8 kb). Se verificó que las construcciones positivas tenían el gen diana correcto por secuenciación de ADN (Laragen, Los Angeles, CA).

20 Electrofisiología

Se realizaron registros de electrofisiología de células enteras como se describe a continuación. Los experimentos se llevaron a cabo usando técnicas de parche-pinza de célula entera de microelectrodos estándar con un amplificador Axopatch 200B (instrumentos Axon) con una velocidad de muestreo de 20 kHz y filtrado de Bessel de paso bajo a 5 kHz. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. Las células se lavaron con una solución de Tyrode normal que contenía (mmol/L): NaCl 138, KCl 5, CaCl₂ 2, glucosa 10, MgCl₂ 0.5 y HEPES 10; pH 7.4. La solución del electrodo de micropipeta estaba compuesta de (mmol/L): K-glutamato 130, KCl 9, NaCl 8, MgCl₂ 0.5, HEPES 10, EGTA 2 y Mg-ATP 5; pH 7.2. Los microelectrodos tenían resistencias de punta de 2 a 4 MΩ cuando se llenaban con la solución de registro interno. Los experimentos de fijación de voltaje se realizaron con un intervalo entre episodios de 2.5 segundos. Los potenciales de acción se iniciaron ya sea por impulsos de corriente despolarizantes cortos (2 a 3 ms, 500 a 800 pA) en GFP-NRVMs o se registraron con el modo 1 = 0 en Tbx18-NRVMs. Los datos se corrigieron para el potencial de unión líquido medido (-mV). Se usó una lámpara de arco de xenón para visualizar la fluorescencia de GFP a 488/530 nm (excitación/emisión).

Construcción y purificación de adenovirus

35 Las construcciones de expresión como se discutió anteriormente se digirieron con PacI para exponer las repeticiones terminales invertidas antes de transfectar en células 293A para producir reservas de adenovirus para uso en la expresión posterior del transgén. Los adenovirus se purificaron en placa, se amplificaron y se purificaron en columna de afinidad usando el kit Adenopure (Puresyn, Inc) y se almacenaron a -80 °C.

Aislamiento y transducción de miocitos

40 Se aislaron los NRVMs de cachorros de rata de 1-2 días y se cultivaron como una monocapa usando métodos de cultivo establecidos. Solo el tercio inferior del corazón (desde el ápice hasta la línea media) fue extirpado para minimizar la contaminación de las células nodales auriculoventriculares. En algunas realizaciones, se usan otras porciones del corazón, que incluyen el tercio inferior, el tercio medio y combinaciones de estas porciones, o corazones enteros (o porciones del mismo) en los que las células marcapasos endógenas se eliminan selectivamente. En algunas realizaciones, se usan biopsias (por ejemplo, biopsias guiadas) para obtener tejido no marcapasos). Se transdujo una monocapa de NRVMs con Ad-Tbx18-IRES-GFP o Ad-GFP (vector de control; moi = 1-10) un día después del aislamiento celular y se cultivó durante 2-5 días. Tbx20, conocido por ser crítico para la diferenciación de la cámara cardíaca, se empleó para controlar los efectos no específicos relacionados con el factor de transcripción embrionario.

Aislamiento de miocitos SA

50 Se aislaron miocitos nodales SA a partir de ratas Sprague-Dawley adultas. Los animales fueron anestesiados con isoflurano. Los corazones se extrajeron rápidamente, las aurículas se separaron de los ventrículos y la región del nódulo sinoauricular se disecó en solución de Tyrode, que consistía en (en mM) 140 de NaCl, 5.4 de KCl, 1.2 de KH₂PO₄, 5 de HEPES, 5.55 de glucosa, 1 de MgCl₂, 1.8 de CaCl₂; pH ajustado a 7.4 con NaOH. La región del nódulo sinoauricular de la rata se definió por los bordes de la cresta terminal, el tabique interauricular y la vena cava superior e inferior.

55

Transducción de células madre embrionarias

Se transfectaron células madre embrionarias de ratón con un vector adenoviral que expresa Shox2 o un gen de control. Los métodos establecidos de cuerpos embrioides se usaron para la diferenciación. Los datos agrupados son $n \geq 3$ con $p < 0.05$ para todas las diferencias informadas.

5 Registros y análisis de calcio intracelular

10 Para mediciones de oscilaciones de Ca^{2+} intracelulares, se sembraron 2×10^6 NRVMs en placas de fondo de vidrio de 35 mm (MatTek Cultureware) o cubreobjetos de vidrio recubiertos con fibronectina de 22 mm, se transdujeron y se analizaron 4 días después de la transducción. Las células se cargaron con Rhod2-AM ($2 \mu\text{mol/L}$) (sondas moleculares) durante 18 minutos, luego se lavaron una vez y posteriormente se colocaron en solución de Tyrode normal con 2 mmol/L de calcio. Los transitorios de calcio se registraron a 37°C a partir de NRVMs transducidos con AdTbx18ISIRES-GFP y Ad-GFP. Las imágenes se adquirieron en un microscopio de escaneo láser confocal invertido (Perkin Elmer/Nikon) o microscopio confocal Leica SP5. El análisis fuera de línea se realizó usando Ultraview (Perkin Elmer) e ImageJ. Los transitorios de Ca^{2+} de células enteras se obtuvieron a partir de imágenes de escaneo de línea confocal a través de NRVMs únicos promediando la señal de una célula individual. Los transitorios de Ca^{2+} se presentan como fluorescencia normalizada y sustraída de referencia (F/F_0). Para la imagen confocal de Ca^{2+} 2-D, se obtuvieron transitorios de calcio promediando la señal a través de la célula entera.

Inmunotinción

20 Las secciones congeladas de nodo sinoauricular de rata neonatal y NRVMs 4 días después de la transducción adenoviral se fijaron con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con Triton-X 100 al 0.1% y luego se incubaron con el anticuerpo primario apropiado: α -actinina sarcomérica (Sigma-Aldrich; A5044; 1: 800), ANP (AbCam; ab-14348; 1: 1000), HCN4 (Abcam; ab85023; 1: 500) y anticuerpos secundarios Alexa Fluor-conjugados (Invitrogen).

Inmunotransferencia

25 Se realizaron transferencias de Western usando anticuerpos específicos contra Cx43 (Sigma-Aldrich, C6219; 1:1000), PLN (Alomone; A010-14: 1: 5000), p-PLB (Alomone; A010-12: 1:5000) HCN4 (AbCam; ab85023; 1:500). En resumen, NRVMs transducidos con Ad-Tbx18, Ad-GFP, SAN de rata y ventrículo izquierdo se homogeneizaron en solución reguladora RIP A que contiene un cóctel inhibidor de proteasa (Sigma). El contenido de proteína se cuantificó por ensayo de BCA y los lisados celulares ($15 \mu\text{g}$ por carril) se corrieron en un gel de SDS-PAGE al 12% y se transfirieron a una membrana de PVDF. A continuación, la membrana transferida se incubó con un anticuerpo primario durante la noche a 4°C , seguido de una incubación de 1 hora con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. La inmunoreactividad se detectó por quimioluminiscencia (ECL Western Blotting Analysis System, Amersham). Se evaluó la carga proteica igual de los geles volviendo a explorar la membrana con anticuerpo monoclonal anti-GAPDH (Abeam; ab9482; 1:10000) o anti- β -actina (Sigma-Aldrich; A3848: 1:25000).

Transferencia génica in vivo

35 Se inyectaron adenovirus en el ápice del ventrículo izquierdo de cobayas. Las cobayas adultas hembras (peso, 250 a 300 g, Charles River) se anestesiaron con isoflurano al 4%, se entubaron y se colocaron en un ventilador con un vaporizador que suministraba isoflurano al 1.5% a 2%. Después de una toracotomía lateral, se insertó una aguja de calibre 30 en el ápice de la pared libre del ventrículo izquierdo. Se inyectaron $100 \mu\text{l}$ de adenovirus que contenían 1×10^9 unidades formadoras de placa de Ad-Tbx18-IRES-GFP o Ad-GFP (grupo control) en el ápice del ventrículo izquierdo. Como se discutió anteriormente, se usan otras rutas de administración en algunas realizaciones.

Electrocardiógrafos (ECG) in vivo y ex vivo

45 Se administró metacolina ($0.1\text{-}0.5 \text{ mg}$ por kg de peso corporal en solución salina, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a través de la vena yugular para ralentizar el ritmo sinusal de los animales antes de los registros de ECG bajo anestesia general (2% de isoflurano, 98% de O_2). Los ECGs se registraron usando un sistema de ECG digital de 2 electrodos a 2 kHz (electrodo 1 y electrodo 3, BIOPAC Systems, Goleta, CA) y el electrodo 2 se calculó fuera de línea mediante el triángulo de Einthoven usando el software Acqknowledge 3.7.3 (BIOPAC Systems, Goleta, CA). En todos los animales, se administró metacolina hasta que se logró el bloqueo cardíaco completo. El bloqueo cardíaco fue acompañado por una reducción del ritmo sinusal de los animales a $<100 \text{ bpm}$. En la mayoría de los cobayas inyectados con Tbx18, los ritmos ventriculares ectópicos se manifestaron mucho antes de que el ritmo sinusal alcanzara 100 bpm (figura 3D, panel derecho). Por el contrario, los animales de control no presentaron evidencia de tales latidos ventriculares ectópicos, incluso cuando el ritmo sinusal se llevó a $<100 \text{ bpm}$ (figura 3D, panel izquierdo). La figura 3D resalta la falta de ritmo ventricular ectópico en los animales de control incluso a una velocidad de escape muy lenta en comparación con los animales inyectados con Tbx18.

55 Para registros de ECG de corazón completo intactos ex vivo, el corazón se perfundió retrógrado a través de la aorta a 60 mmHg con solución de Tyrode oxigenada a 36°C . El corazón perfundido se colocó en una placa revestida de

Sylgaria llena de solución de Tyrode caliente. Los electrodos del ECG se colocaron en sitios apropiados para hacer el registro de los electrodos I y II (figura 28). Después de un período de equilibrio de 20 minutos, se ablacionó la región del nódulo auriculoventricular con un cryogun (Brymill Cryogenic Systems, Ellington, CT) lleno de N₂ líquido. La electroestimulación se realizó en el sitio de la inyección transgénica (anterior, ápice del ventrículo izquierdo) a intervalos de 200 ms con un electrodo de platino conectado a un estimulador de pulso aislado (Modelo 2100, AM Systems, Carlsborg, WA).

RT-PCR para matrices de genes

Se recogieron los nódulos sinoauriculares de rata, el ventrículo izquierdo y los NRVMs transducidos con Tbx18 y GFP (4 días después de la transducción) y se extrajo el ARNm (kit de aislamiento de ARNm de Qiagen). Las muestras de ARNm se convirtieron en ADNc de la primera cadena, usando el kit RT2 First Strand (SA Biosciences). A continuación, la plantilla de ADNc se mezcló con la mezcla maestra qPCR RT2 y la mezcla se dividió en alícuotas en cada pocillo de la misma placa que contenía conjuntos de cebadores específicos de genes dispensados previamente. La PCR se realizó en un sistema de PCR rápida en tiempo real 7900HT (Applied Biosystems/Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) y se calculó la expresión relativa de los genes.

15 Ensayo cAMP

Se usó el kit de ensayo de Elisa AMP cíclico (catálogo # STA-501; Cell Biolabs, INC) para determinar los niveles de cAMP en NRVMs transducidos con Ad-Tbx18 o Ad-GFP. En resumen, se añadieron 50 µl de lisados de células Tbx18 y GFP-NRVM a la placa de 96 pocillos recubiertos con anticuerpo anti-conejo de cabra. Se añadieron 25 µl de conjugado de trazador de peroxidasa cAMP diluido a cada pocillo probado. A continuación, se añadieron 50 µl de anticuerpo policlonal de conejo anti-cAMP diluido a cada pocillo probado y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación. Después de lavar, se añadieron 100 µl de reactivo quimioluminiscente a cada pocillo. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos en un agitador orbital, se leyó la placa para la luminiscencia de cada micropocillo en un luminómetro de placa. La medición de la emisión de luz (RLU) permitió calcular la cantidad de cAMP en muestras que luego se normalizaron a β-actina para la comparación de las muestras.

Soluciones

Solución de Tyrode que contiene (mm): NaCl 140, KCl 5.4, CaCl₂ 1.5, MgCl₂ 1.5, glucosa 10 y Hepes 5; pH ajustado a 7.38 con NaOH. Rianodina y proteína quinasa I (PKI) se compraron de Tocris biosciences y la cafeína se adquirió en Sigma. Rhod-2/AM y fue comprado a Invitrogen.

30 Inmunoprecipitación de cromatina

Los NRVMs transducidos con ya sea Tbx18 o GFP se fijaron dos a cuatro días después de la transducción del vector viral con formaldehído al 10% durante 8 minutos a temperatura ambiente. Las células se sometieron a cizallamiento usando un sonicador con diez pulsos de 20 segundos cada uno, con un descanso de 30 segundos en hielo entre cada pulso. La inmunoprecipitación con cromatina se realizó usando el kit ChIP-IT® Express Chromatin Immunoprecipitation (Active Motif, Carlsbad, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. Los anticuerpos primarios para H3K4me3 y H3K27me3 se adquirieron de Active Motif.

qPCR después de la inmunoprecipitación de cromatina

Se compraron cebadores específicos de gen (Cx43, Kir2.1, α-SA, HCN4), ya validados para qPCR en rata, de SA Biosciences. Para cada gen, se emplearon tres conjuntos de cebadores correspondientes a -2 kb (aguas arriba), -1kb y + 1kb (aguas abajo) del sitio de inicio de la transcripción. Los valores de ΔCt de las tres fichas se promediaron de cada experimento para el análisis de datos.

PCR cuantitativa en tiempo real de célula única

Se recogieron miocitos individuales en PBS con una pipeta de parche de abertura amplia, se colocaron en hielo seco y luego se almacenaron a -80 °C. Los niveles de mRNA de Tbx18 en miocitos individuales se examinaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real con un kit Ambion® Single Cell-to-CT™ (Life Technologies) según las instrucciones del fabricante. En resumen, se trataron células individuales con solución de lisis celular y ADNasa I durante 5 minutos a temperatura ambiente. La transcripción inversa se realizó a 25 °C, durante 10 minutos, a 42 °C, durante 60 minutos y a 85 °C, durante 5 minutos después de la adición de la mezcla Superscript RT y VILO RT. La preamplificación se realizó con 14 ciclos de 95 °C, durante 15 segundos y 60 °C, durante 4 minutos con adición de mezcla PreAmp y 0.2x TaqMan Gene Expression Assays, que contiene cebadores para Tbx18 humano (ID del ensayo: Hs01385457_ml), GAPDH de cobaya (ensayo ID: Cp03755742_g1), y conejillo de Indias TnnT2 (ID del ensayo: Cp04182357_g1). Los cebadores personalizados fueron sintetizados por Applied Biosystems (Carlsbad, CA). Los productos de preamplificación (dilución 1:20) se usaron para PCR en tiempo real con ensayos de expresión génica TaqMan usando un sistema de PCR rápido en tiempo real Applied Biosystems 7900HT. Las curvas estándar para cada uno de los 3 conjuntos de cebadores se construyeron con diluciones en serie de plantillas de ADN de

entrada (figura 30) y eficiencias de amplificación comparables validadas (pendientes de la curva: -3,32 a -3,64). Los niveles relativos de ARNm de Tbx18, GAPDH y TnnT2 se obtuvieron mediante la extrapolación de los valores de Ct con las pendientes de la curva estándar para cada conjunto de cebadores. La expresión del ARNm de Tbx18 en cada célula se normalizó entonces a nivel de GAPDH o TnnT2.

5 Análisis estadístico

Los datos se analizaron para determinar la media, la desviación estándar y el error estándar de la media (SEM). Las cifras cuantitativas en este trabajo representan la media de \pm SEM. Los conjuntos de datos se evaluaron estadísticamente usando una prueba t no apareada. $p < 0.05$ se consideró significativo a menos que se indique lo contrario.

10 Ejemplo 1 - Células marcapasos creadas por entrega de genes a NVRMs

Como se discutió anteriormente, las terapias actuales para arritmias cardíacas causadas por anomalías de tejido excitable dependen principalmente de farmacoterapia, ablación por radiofrecuencia, dispositivos implantables y otros enfoques relacionados. Estos métodos, si bien son útiles para el tratamiento de algunas formas de arritmias, tienen limitaciones (como se discutió anteriormente). Los marcapasos biológicos ofrecen ventajas sobre el uso de marcapasos tradicionales y se pueden usar en lugar de, o en conjunción con los marcapasos tradicionales. El presente estudio evaluó el uso de agentes inductores del factor de transcripción para la generación de marcapasos biológicos.

Para demostrar que la transducción de factores de transcripción a células cardíacas produce marcapasos biológicos, se realizó la transducción heteróloga singular de factores de transcripción seleccionados en vectores adenovirales bicistrónicos en NVRMs recién aislados. Como un cribado inicial, se analizó el número de cultivos que latían espontáneamente 36-48 horas después de la transducción. Los NVRMs transfectados con Tbx18 (Tbx18-NVRMs) presentaron un porcentaje aumentado de cultivos de monocapa de latido espontáneo en comparación con el control y otros factores de transcripción cribados (un mínimo de cinco aislamientos celulares diferentes por grupo, Figura 2A). Más allá de los dos días de cultivo, se observaron múltiples focos de latido espontáneo en monocapas Tbx-NRVM individuales, como se esperaba a partir de la regulación negativa de Cx43 (pero no de Cx45 o Cx40) por Tbx. De acuerdo con lo anterior, Tbx se seleccionó como candidato para convertir los cardiomiocitos ventriculares en células marcapasos. De este modo, en varias realizaciones, Tbx18 se usa para crear un marcapasos biológico. Sin embargo, en varias realizaciones, se usan otros factores de transcripción, que incluyen uno o más de los seleccionados en el experimento actual. En varias realizaciones, se usarán combinaciones de dos o más factores de transcripción. En varias realizaciones, Shox2 se usará en conjugación con Tbx18 para lograr estos resultados. En varias realizaciones, se seleccionarán uno o más de los siguientes factores de transcripción para su uso: Tbx18, Shox2, Tbx3 y Tbx5.

Aunque los NVRMs presentan contracciones sincitiales espontáneas cuando se cultivan como monocapas, dicho fenómeno es impulsado por un número relativamente pequeño de células de latido autónomo. La figura 2B muestra los rastros de potencial de acción representativo (AP). Cuando se siembra en placas escasamente a una densidad de ~ 4 NVRMs/mm² de modo que una célula dada es poco probable que haga contacto físico con las células vecinas, la mayoría de los miocitos ventriculares de control (GFP) estaban inactivos (7 de 9), activando solo potenciales de acción simple después de la estimulación (figura 2B, izquierda). La expresión de Tbx18 transformó el fenotipo eléctrico al de las células SAN; la mayoría de Tbx18-NVRMs (7 de 9) latieron de forma autónoma y espontánea (figura 2B, derecha). Se apreciará que, en varias realizaciones, podría usarse Shox2 en lugar de o junto con Tbx18. En varias realizaciones, se seleccionarán uno o más de los siguientes factores de transcripción para su uso: Tbx18, Shox2, Tbx3 y Tbx5. Los Tbx18-NVRMs presentaron APs espontáneos con prominente despolarización progresiva de fase 4. La despolarización gradual de fase 4 subyace a la automaticidad en las células marcapasos SAN, y es prominente en los Tbx-NVRMs (figura 2B). Este aumento en los latidos autónomos y la despolarización gradual indica que estas células están funcionando de manera consistente con las células del nódulo sinoauricular natural, lo que sugiere que Tbx18 (solo o en combinación con otros factores de transcripción) está generando células marcapasos. En algunas realizaciones, se detectan funciones similares en células madre, y que, por lo tanto, indica que las células son útiles en la generación de marcapasos biológicos y en el tratamiento de arritmias.

El potencial diastólico máximo (MDP) de -47 ± 10 mV ($n = 6$) en Tbx18-NVRMs se despolarizó en relación con el potencial de membrana en reposo (RMP) de -73 ± 6 mV en GFP-NVRMs ($n = 5$, Figura 2C, izquierda). Esto sugiere que las células transducidas con Tbx-18 activarán con más frecuencia que las células de control, al igual que se espera que las células con marcapasos lo hagan. Los grupos GFP y Tbx18 están indicados por barras blancas y sombreadas, respectivamente, a lo largo de los datos presentados. Como se usa en este documento, el término "índice de automaticidad" tendrá su significado ordinario y también se definirá como el porcentaje de células de latido autónomo multiplicado por la frecuencia de oscilaciones de potencial de acción (AP) en esas células, era mucho más grande en Tbx-NVRMs ($70 \pm 16\%$ bpm) en comparación con el control ($136 \pm 4\%$ bpm, Figura 2C, centro). Como se muestra en la figura 2C en el medio, la automaticidad aumentó en relación con el control de GFP en alrededor del 60%. En algunas realizaciones, el aumento en el índice de automaticidad será de 5% a aproximadamente 15%, aproximadamente 15% a aproximadamente 25%, aproximadamente 25% a aproximadamente 35%, aproximadamente 35% a aproximadamente 45%, aproximadamente 45% a aproximadamente 55%,

- aproximadamente 55% a aproximadamente 65%, aproximadamente 65% a aproximadamente 75%, aproximadamente 75% a aproximadamente 85%, aproximadamente 85% a aproximadamente 95%, aproximadamente 95% a aproximadamente 100%, y los intervalos de solapamiento del mismo, en relación con la automaticidad de las células marcapasos normales. El número de células que tienen oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} también aumentó en relación con los controles (figura 2C, derecha). El número de Tbx18-NRVMS que presentan oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} intracelular fue aproximadamente 6 veces mayor en relación al control (figura 2C, derecha). Debido a que el Ca^{2+} es necesario para la generación de un potencial de acción en las células marcapasos, estos datos también demuestran que la transducción de células con Tbx18 (solo o en combinación con otros factores de transcripción) puede utilizarse con éxito en la generación de células marcapasos.
- El cambio en el potencial diastólico, la automaticidad y la oscilación de Ca^{2+} se complementó con una reducción del 78% en la densidad de I_{K1} en Tbx18-NRVMS (Fig. 2D). Izquierda: rastros en bruto de I_{K1} representativos provocados por un protocolo de rampa de -140 a -20 mV. Las densidades resumidas de I_{K1} a -140 mV se muestran en 2D a la derecha. En varias realizaciones, la reducción en la densidad de I_{K1} estará entre aproximadamente 5% a aproximadamente 15%, aproximadamente 15% a aproximadamente 25%, aproximadamente 25% a aproximadamente 35%, aproximadamente 35% a aproximadamente 45%, aproximadamente 45% a aproximadamente 55%, aproximadamente 55% a aproximadamente 65%, aproximadamente 65% a aproximadamente 75%, aproximadamente 75% a aproximadamente 85%, aproximadamente 85% a aproximadamente 95%, aproximadamente 95% a aproximadamente 100%, y los intervalos de solapamiento del mismo. La reducción en la densidad de I_{K1} también indica que las células transducidas activarán con mayor frecuencia en relación con las células no tratadas (por ejemplo, las células que no son marcapasos). Este aumento en la activación indica que estas células transducidas están funcionando como células marcapasos. De este modo, los métodos usados para generar estas células, o métodos usados para generar células marcapasos a partir de células madre, se pueden usar en el tratamiento de arritmias cardíacas u otras enfermedades que están asociadas con una tasa de activación de células cardíacas interrumpida.
- HCN4 es el correlato molecular de la corriente activada por hiperpolarización, I_f , que contribuye a la actividad del marcapasos en la SAN. La transducción de Tbx18 condujo a un aumento de 3.8 veces en el número de células que expresan HCN4 (figura 2E). La imagen de inmunotinción de HCN4 (HCN4-blanco, azul de núcleo) de GFP- o Tbx18-NRVMS se muestra en la izquierda y en el medio, respectivamente. Barra de escala: 200 μm . Panel derecho: resumen del porcentaje de células positivas para HCN4 por células transducidas con GFP o Tbx18. La expresión de Tbx18 también condujo a un aumento de 1.4 veces en el nivel de proteína de HCN4 (figura 2F) en Tbx18-NRVMS. Tales células también exhibieron I_f (Fig. 2G) a una densidad (-5.2 ± 1.3 pA/pF a -140 mV, $n = 3$) consistente con la informada en las células SAN de conejo. La transferencia de Western indica un nivel de proteína de HCN4 más alto en Tbx18-NRVMS en relación con el control (izquierda) comparable al nivel de HCN4 observado en la SAN de rata adulta (derecha). Los eventos de ciclación de Ca^{2+} se complementan y se combinan con las corrientes iónicas sarcolemales para generar automaticidad. La comparación de los niveles de transcripción para los componentes seleccionados de los mecanismos dependientes de voltaje y calcio revelaron diferencias en Tbx18 versus GFP-NRVMS que recapitulan estrechamente aquellos entre SAN nativa y miocardio ventricular, utilizados en este documento como controles positivos (figura 2H). Cambios de los niveles relativos de ARNm de genes seleccionados que comparan Tbx18-NRVMS normalizados con GFP-NRVMS (izquierda) y SAN normalizados a LV (derecha). SAN y Tbx18-NRVMS demuestran un patrón similar de niveles de transcripción normalizados. De este modo, en varias realizaciones, Tbx18 también provoca cambios en la expresión de genes y proteínas que están asociados con la formación de marcapasos biológicos.
- La figura 2B muestra que las células Tbx18 eran más propensas a activar y activar de una manera (con despolarización lenta) como la de las células SAN nativas. La figura 2C muestra que las células Tbx18 tienen un potencial diastólico más bajo (centro) lo que resulta en un índice más alto de automaticidad (medio) y más oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} de células enteras (izquierda). La figura 2D muestra que la densidad de corriente de las células Tbx18 tiene menos tiempo de repolarización y, de este modo, una mayor probabilidad de activar. Juntos, estos datos indicaron que, en algunas realizaciones, Tbx18 cambia las propiedades eléctricas de las células y las hace similares a SAN. Cada uno de estos resultados indica una mayor probabilidad de que estas células se activen automáticamente cuando se implantan o se generan en el corazón vivo. De este modo, en varias realizaciones, estas células marcapasos inducidas pueden latir y pueden modular el ritmo cardíaco para tratar arritmias cardíacas u otras enfermedades asociadas con un ritmo cardíaco anormal.
- Mientras que las rutas electrofisiológicas delimitadas por membrana contribuyen a la marcar el paso, las células SAN se activan para activar rítmicamente mediante eventos de ciclación de Ca^{2+} intracelular distintivamente orquestados. Los eventos de liberación de Ca^{2+} localizados espontáneamente subsarcolemales son una marca distintiva de la automaticidad en las células del nódulo sinoauricular. Durante la diástole tardía, las LCRs activan las corrientes de intercambiador de Na^+ - Ca^{2+} (INCX), que luego contribuyen a la fase exponencial de la despolarización de la fase 4. Se realizaron mediciones de LCR en Tbx18-NRVMS para caracterizar sus perfiles de ciclación de Ca^{2+} .
- Durante la diástole tardía, las LCRs activan las corrientes de intercambiador Na^+ - Ca^{2+} (INCX), que luego contribuyen a la fase exponencial de la despolarización de la fase 4. Las imágenes confocales de barrido lineal de Tbx18-NRVMS resolvió LCRs antes de cada transitorio de Ca^{2+} de célula entera (figura 3A, $n = 8$ de cada 10

células), recapitulando las LCRs observaron SAN marcapasos nativas. Las imágenes confocales de barrido lineal representativas de cambios en $[Ca^{2+}]_i$ en Tbx18-NRVMs (figura 3A) y GFP-NRVMs (figura 3B) cargados con Rhod2/AM, 4 días después de la transducción representan LCRs que preceden el transitorio de Ca^{2+} de célula entera solo en el Tbx18- NRVMs, mientras que las chispas ocasionales de Ca^{2+} podrían detectarse en los GFP-NRVMs. El período de LCR se define como el período comprendido entre el inicio del transitorio de Ca^{2+} y el comienzo de la LCR posterior. La duración del ciclo se define como el período entre el inicio del transitorio de Ca^{2+} de célula entera y el inicio del posterior transitorio de Ca^{2+} . Las LCRs representaron la periodicidad con un período promedio de $72\pm 1\%$ del de la duración del ciclo (figura 3C). De este modo, Tbx18 solo o con otros factores de transcripción, convierte funcionalmente cardiomiocitos en células que tienen actividades de Ca^{2+} similares a las del marcapasos.

Las LCRs en Tbx18-NRVMs ocurrieron en un período promedio de 343 ± 8 ms, que era $72\pm 1\%$ de la duración del ciclo transitorio de Ca^{2+} de células enteras (474 ± 7 ms, Figura 3D). En algunas realizaciones, la LCR tendrá lugar entre aproximadamente 5% a aproximadamente 15%, aproximadamente 15% a aproximadamente 25%, aproximadamente 25% a aproximadamente 35%, aproximadamente 35% a aproximadamente 45%, aproximadamente 45% a aproximadamente 55%, aproximadamente 55% a aproximadamente 65%, aproximadamente 65% a aproximadamente 75%, aproximadamente 75% a aproximadamente 85%, aproximadamente 85% a aproximadamente 95%, aproximadamente 95% a aproximadamente 100%, y los intervalos de solapamiento de los mismos, de la duración del ciclo transitorio de Ca^{2+} de células enteras. Los diagramas F/F0 promediados espacialmente de cambios en $[Ca^{2+}]_i$ representaron un aumento de 2.3 veces en los transitorios de Ca^{2+} inducidos por cafeína (20 mM) en los Tbx-NRVMs en comparación con los controles. En contraste, las LCRs no se detectaron en las células control ($n \sim 12$ de 12 células, Figura 3D), aunque se observaron ocasionalmente chispas distribuidas aleatoriamente (por ejemplo, Figura 3B). Es probable que las mayores reservas de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico (SR) promuevan la automaticidad. La amplitud de los transitorios de Ca^{2+} inducidos por cafeína fue 2.3 veces mayor en Tbx18-NRVMs en comparación con el control (figura 3D).

Los experimentos de transferencia de Western demostraron una disminución en los niveles totales de PLB y un aumento en PLN fosforilada (se16) similar a la SAN de rata adulta (figura 3F). No se observaron cambios en los niveles de proteína de SERCA2A, NCX1 y RyR en los Tbx18-NRVMs en comparación con los controles (figura 3G). El bloqueador del canal de liberación de Ca^{2+} , rianodina (10 μ M), suprimió la tasa de transitorios espontáneos de Ca^{2+} en un $47\pm 6\%$ en Tbx-NRVMs, pero solo en un $12\pm 2\%$ en el control (figura 3E). Estos resultados indican que la transducción con Tbx18 (solo o en combinación con otros factores de transcripción) se puede usar, en varias realizaciones, para generar marcapasos biológicos, o en algunas realizaciones, usados para generar células que se pueden implantar más tarde para funcionar como biomarcapasos.

El fosfolamban (PLN), en su estado no fosforilado, inhibe el retículo sarcoplásmico Ca^{2+} -ATPasa 2a (SERCA2a), suprimiendo así la reabsorción de Ca^{2+} por las reservas internas. Tal inhibición se alivia con la fosforilación de la proteína (P-PLB). El nivel relativo de p-PLN (Ser16) fue 65 veces mayor en Tbx-NRVMs en comparación con GFP-NRVMs (figura 3F, panel izquierdo), imitando el aumento de p PLN encontrado en la SAN en comparación con el del miocardio ventricular (figura 3F, panel derecho). Mientras tanto, las diferencias en los niveles de proteína de SERCA2a, NCX1 y receptor de rianodina (RyR) no fueron detectables entre Tbx- y GFP-NRVMs (figura 3G), lo que concuerda con los hallazgos en el nódulo sinoauricular del conejo versus el ventrículo izquierdo. Los niveles intracelulares de cAMP fueron 1.7 veces mayores en Tbx18-NRVMs en comparación con GFP-NRVMs (figura 3H), reproduciendo el mayor [cAMP]; observado en la SAN de conejo en comparación con el miocardio ventricular como se conoce en la técnica. La aplicación de un inhibidor de PKA (PKI, 15 μ M) condujo al cese de los transitorios de Ca^{2+} de células enteras espontáneos en Tbx-NRVMs, pero no tuvo efecto sobre los GFP-NRVMs (figura 3I). De este modo, la expresión de Tbx18 en NRVMs produjo cambios en componentes clave de ciclación Ca^{2+} que recapitulan características clave de las células marcapasos de nodo sinoauricular, permitiendo así, en varias realizaciones, transducción de células con Tbx18 (solo o en combinación con otros factores de transcripción, dependiendo de la realización) para ser usado en métodos terapéuticos para tratar arritmias cardíacas.

Cambios fenotípicos en la célula reprogramada

Además de los cambios electrofisiológicos, la reprogramación celular replica características clave de la estructura celular en tejido de marcapasos. Las células marcapasos del nódulo sinoauricular nativo son distintivas en su morfología: son más pequeñas y presentan miofibrillas menos organizadas que los cardiomiocitos en funcionamiento. Para probar si Tbx18-NRVMs tenía cambios fenotípicos, se investigó la morfología de las células.

Las secciones de corazón de rata neonatal demuestran que la expresión de α -actinina sarcomérica cardíaca (α -SA) es marcadamente más baja y desorganizada en el nódulo sinoauricular en comparación con la aurícula derecha adyacente (RA, figura 4A, parte superior izquierda y parte inferior izquierda). Tbx 18-NRVMs se asemejaba a las células del nódulo sinoauricular nativo en su morfología, con desorganización miofibrilar y expresión débil de α -SA (figura 4A, parte inferior derecha). El nodo sinoauricular de rata neonatal, demarcado por la expresión de HCN4 (parte superior media), presenta expresión de α -actinina sarcomérica (α -SA) más débil y no estructurada (panel superior). Parte inferior izquierda: imagen de acercamiento del área en la caja en la parte superior a la izquierda. El patrón se recapitula fielmente en Tbx18-NRVMs en comparación con GFP-NRVMs (parte inferior derecha y media,

respectivamente). Barra de escala: 30 μm . Los datos se corroboran mediante la regulación negativa observada de los niveles de transcripción α -SA en Tbx18-NRVMS (figura 2H). El tamaño de la célula, medido por dos métodos complementarios, es 28-33% más pequeño en Tbx18-NRVMS que en los NRVMS de control (figura 4B), recapitulando el tamaño más pequeño de las células SAN en relación con los cardiomiocitos en funcionamiento. De este modo, los Tbx18-NRVMS se sometieron tanto a la reprogramación estructural (morfología) como funcional (electrofisiología).

Se investigó entonces si los cambios en el fenotipo tipo nódulo sinoauricular están asociados con un estado de cromatina tipo nódulo sinoauricular en Tbx18-NRVMS. La trimetilación de la lisina 27 en la histona 3 (H3K27me3) es una marca de heterocromatina que promueve el reclutamiento de las proteínas del grupo Polycomb para el silenciamiento génico. Por el contrario, la trimetilación de la lisina 4 (H3K4me3) marca los genes transcripcionalmente activos. Se investigaron luego los perfiles de modificación de histonas en las regiones promotoras de cuatro genes, Cx43, Kir2.1, Actc2 y HCN4. Tbx18 es un factor de transcripción que se requiere para el desarrollo embrionario del área de la cabeza del nodo sinoauricular. Shox2 es un regulador negativo de Nkx2.5 en el seno venoso (como se discutió anteriormente). Tbx3 es un potente regulador de la especialización del nodo sinoauricular, con errores de desarrollo resultantes de ya sea la deficiencia o expresión ectópica. Tbx5 es un regulador positivo de Shox2 y Tbx3. Estos genes presentan cambios moleculares y funcionales relevantes en Tbx18-NRVMS. El nivel de trimetilación en H3K27 indica que Tbx18 aumentó la inactividad de los promotores Cx43, Kir2.1 y α -SA mientras que alivia su presión epigenética represiva sobre el promotor HCN4 normalizado para controlar. Estos resultados se midieron mediante inmunoprecipitación de cromatina seguida por qPCR. Mientras tanto, los niveles de H3K4me3 (figura 4C derecha) indican que la proporción de regiones promotoras de HCN4 activas aumentó con la expresión de Tbx18 mientras que las regiones promotoras activas transcripcionalmente de Cx43, Kir2.1 y α -SA disminuyeron con la expresión de Tbx18. Cx43, Kir2.1 y Actc2 se volvieron epigenéticamente inactivos (H3K27me3 más alto y H3K4me3 inferior) en Tbx18-NRVMS en comparación con el control (figura 4C). Como resultado, estos datos sugieren que la expresión de Tbx18 reduciría una o más de las expresiones Cx43, Kir2.1 y α -SA, mientras que HCN4 estaría regulada positivamente. Como HCN4 está implicada en señales repetitivas, estos datos son consistentes con la formación de marcapasos biológicos. Además, las modificaciones de la histona de la cromatina son consistentes con la reprogramación epigenética duradera en lugar de la reingeniería funcional transitoria.

En la figura 5, la expresión del péptido natriurético auricular (ANP) en NRVMS se indujo mediante estimulación de 24 horas con endotelina-1 (100 nM), un vasoconstrictor. Sin embargo, la expresión de ANP inducida se suprimió mediante la expresión de Tbx18 (5B, panel inferior) mientras que la GFP no tuvo efecto (5A, panel inferior). Barra de escala: 20 μm . Cada uno de estos cambios fenotípicos muestra que las células transducidas con Tbx18 parecen ser más del tipo nódulo sinoauricular que los cardiomiocitos que no reciben tratamiento. Esto refleja una reprogramación de la célula que es tanto estructural como fisiológica, generando de este modo una célula marcapasos biológica que es similar a las células del nódulo sinoauricular.

En varias realizaciones, al menos uno de Cx43, Kir2.1 y Actc2 se pueden convertir en epigenéticamente inactivos en células iSAN en comparación con las células quiescentes. En varias realizaciones, la expresión de α -actinina sarcomérica en células iSAN puede ser débil en comparación con las células quiescentes. Además, en varias realizaciones, las células iSAN pueden presentar desorganización miofibrilar. Solo uno de tales cambios puede ocurrir, o combinaciones del mismo pueden ocurrir, dependiendo de la realización; sin embargo, cada uno de los anteriores son consistentes con un desplazamiento de una célula hacia un fenotipo tipo nódulo sinoauricular. Además, en varias realizaciones las células marcapasos se generan sin la expresión de alteración inducida de las proteínas del canal iónico, cuya introducción genética puede ser contraria a los datos anteriores (por ejemplo, la reducción en Kir2.1 que contribuye, al menos en parte, a la formación iSAN, podría ser compensada por la introducción genética de canales Kir2.1).

45 Ejemplo 2: Aplicación in vivo de marcapasos biológicos inducidos por factores de transcripción

El ejemplo anterior estableció la capacidad de Tbx18 para inducir cambios en la expresión y función de genes/proteínas in vitro. De este modo, también se investigó la posibilidad de reprogramar miocitos ventriculares adultos en células marcapasos in vivo. Un vector adenoviral que codifica Tbx18 se inyectó directamente y focalmente en el ápice de corazones de cobaya. En algunas realizaciones, la inyección será a otras áreas del corazón y a veces en varias áreas a la vez. Debe apreciarse que la cobaya es un modelo aceptado para su uso en estudios cardiovasculares, y los datos pueden extrapolarse fácilmente a otros mamíferos, incluido el humano. En algunas realizaciones, la administración del vector adenoviral Tbx18 se realizará en diversos corazones de mamíferos, incluido el del corazón humano.

Dos o cuatro días después de la inyección en los corazones de cobayas, se verificaron los corazones en busca de señales similares a marcapasos que se originaban en el sitio de inyección. Al desacelerar el ritmo sinusal, ninguno de los siete animales de control (inyectados con GFP) presentaba ritmos de escape de complejo amplio, lo que indicaría la función del marcapasos (figura 6A izquierda). En las mismas condiciones, 5 de 7 animales inyectados con Tbx18 demostraron latidos ventriculares ectópicos frecuentes (complejos QRS más anchos con polaridad negativa en electrodo II, Figura 7A) a una velocidad de 40 ± 21 bpm (figura 6B). La tasa de latidos ventriculares ectópicos en animales inyectados con Tbx18 el día 3-5 después de la entrega de genes es significativamente mayor

que el control (figura 6B). En algunas realizaciones, la velocidad de latido de las células marcapasos estará entre aproximadamente 5% a aproximadamente 15%, aproximadamente 15% a aproximadamente 25%, aproximadamente 25% a aproximadamente 35%, aproximadamente 35% a aproximadamente 45%, aproximadamente 45% a aproximadamente 55%, aproximadamente 55% a aproximadamente 65%, aproximadamente 65% a aproximadamente 75%, aproximadamente 75% a aproximadamente 85%, aproximadamente 85% a aproximadamente 95%, aproximadamente 95% a aproximadamente 100%, y los intervalos de solapamiento de los mismos, de la velocidad de latido normal de las células sanas de marcapasos. Este latido corresponderá a una nueva frecuencia cardíaca del mamífero, que incluye al ser humano, de aproximadamente 5% a aproximadamente 15%, aproximadamente 15% a aproximadamente 25%, aproximadamente 25% a aproximadamente 35%, aproximadamente 35% a aproximadamente 45%, aproximadamente 45% a aproximadamente 55%, aproximadamente 55% a aproximadamente 65%, aproximadamente 65% a aproximadamente 75%, aproximadamente 75% a aproximadamente 85%, aproximadamente 85% a aproximadamente 95%, aproximadamente 95% a aproximadamente 100%, o los intervalos de superposición del mismo, del corazón normal. El análisis del vector electrocardiográfico reveló que los latidos ectópicos se originaron en el sitio de la inyección del gen (ápice) y se propagaron hacia la base (figura 6A, derecha). En contraste, los extraños latidos de escape observados en los controles no se originaron en el sitio de la inyección: eran estrechos y se propagaban hacia el ápice desde la unión auriculoventricular (figura 6A, izquierda). De este modo, la transducción in vivo de los ventrículos con la actividad de marcapasos ectópico inducida por Tbx18, que indica que Tbx18 se puede utilizar en el tratamiento de anomalías de tejido excitable. En varias realizaciones, Shox2 podría usarse en lugar de o además de Tbx18. En varias realizaciones, se seleccionarán uno o más de los siguientes factores de transcripción para su uso: Tbx18, Shox2, Tbx3 y Tbx5. También se apreciará que, en varias realizaciones, las células madre, células progenitoras, células somáticas y/o cardiomiocitos se podrían transfectar con genes para los factores de transcripción anteriores. A continuación, estas células, después de verificar la generación de actividad de marcapasos, se pueden implantar in vivo para tratar anomalías de tejidos excitables.

25 Cambios morfológicos

La fidelidad de la reprogramación se probó expresando Tbx18 en ventrículos de cobaya adulta y comparando las propiedades de los miocitos ventriculares transducidos con Tbx18 (Tbx18-VMs) con los de los miocitos ventriculares transducidos con GFP (como controles, VMs control) y células SAN nativas. Los adenovirus que expresan conjuntamente Tbx18 y GFP, o GFP solo, se inyectaron directamente en el ápice del corazón de cobaya (4×10^7 cfu/corazón). Cinco días después de la inyección, se recogió el corazón y se aislaron los cardiomiocitos del sitio de la inyección del gen.

Las células del nódulo sinoauricular nativas son más pequeñas y delgadas que los miocitos ventriculares no transducidos: las proporciones de longitud a ancho (LtW) son iguales a 14.7 ± 1.5 ($n = 24$) y 7.6 ± 0.7 ($n = 9$, $p < 0.05$), respectivamente. Los miocitos ventriculares control recién aislados mantuvieron su forma nativa (con $LtW = 7.4 \pm 0.9$, $n = 4$); en contraste, los miocitos ventriculares Tbx18 eran más delgados ($LtW = 16.0 \pm 1.0$, $n = 12$, $p < 0.05$) que los miocitos control ventriculares y con frecuencia tenían forma de huso, reproduciendo las marcas distintivas morfológicas de las células SAN. Los miocitos ventriculares control tenían potenciales de reposo estables a -76 mV, con potenciales de acción provocados únicamente por la estimulación eléctrica. Por el contrario, Tbx18-VM demostró la despolarización diastólica (máximo potencial diastólico = -59 mV) y potenciales de acción espontánea activados a 26 bpm. De este modo, las células transducidas con Tbx18 funcionan más como células marcapasos. La capacitancia de células enteras, una medida del tamaño de las células, era más pequeña en los miocitos ventriculares Tbx18 que en los miocitos ventriculares control (40.8 ± 3.6 vs. 119 ± 16 pF, respectivamente). Las características electrofisiológicas y morfológicas de Tbx18-VM por lo general se asemejan a las de las células SAN nativas (figura 8 y 9). Estos datos muestran que la transferencia génica somática de Tbx18 en el ventrículo in vivo produjo células SAN inducidas (iSAN) que recapitulan fielmente las propiedades fenotípicas clave de las células SAN genuinas. La reprogramación in situ fue eficaz y rápida en velocidad (tan solo cinco días), ofreciendo un enfoque novedoso para crear un marcapasos biológico como alternativa a los dispositivos electrónicos. Los datos indican que en varias realizaciones las células iSAN tendrán una proporción de longitud a ancho mayor que los miocitos ventriculares no transducidos. En varias realizaciones, esta relación LtW será mayor que aproximadamente 2, aproximadamente 4, aproximadamente 6, aproximadamente 8, o aproximadamente 10. En varias otras realizaciones, esta relación LtW será aproximadamente igual a 15. En aun realizaciones adicionales, la proporción variará desde aproximadamente 10 a aproximadamente 12, aproximadamente 12 a aproximadamente 14, aproximadamente 14 a aproximadamente 16, aproximadamente 16 a aproximadamente 20, o mayor. En varias realizaciones, otras características fenotípicas de las células iSAN se asemejan a las de las células marcapasos nativas (por ejemplo, más de cerca que las células ventriculares no transducidas).

Ejemplo 3: prueba de transformación somática a somática en lugar de desdiferenciación

Tbx18 es un marcador de progenitores multipotentes en desarrollo cardíaco, y se ha asociado con neoplasia. Se sabe que las células madre pluripotentes (embrionarias o inducidas) se diferencian espontáneamente en células marcapasos. De este modo, para reducir la preocupación por la neoplasia, se realizaron pruebas para asegurar que la transducción de Tbx18 no produjera células marcapasos a través de un estado pluripotente/neoplásico, lo que podría ocurrir al acelerar la desdiferenciación que se sabe que ocurre en los cardiomiocitos cultivados. Sin embargo,

los datos presentados en este documento indican que la morfología similar a SAN de Tbx18-VMs no es indicativa de regresión inespecífica. Por ejemplo, las VMs adultas desdiferenciadas pierden la forma longitudinal de "ladrillo" y se vuelven más bien circulares, similares a sus contrapartes neonatales, pero no se vuelven más delgadas. Además, indicando que Tbx18 induce una reingeniería específica en lugar de la reversión a un estado fetal son los siguientes.

5 En primer lugar, la desdiferenciación se acompaña de la reexpresión de genes característicos del corazón fetal, que incluyen el péptido natriurético auricular (ANP) y la α -actina del esqueleto (α SkA). Ni ANP ni α SkA se reexpresaron en Tbx18-NRVMS (células iSAN); de hecho, la expresión de ANP estaba fuertemente suprimida (figura 5C y 5A, B, respectivamente). En segundo lugar, la desdiferenciación acercaría los miocitos transducidos a un estado progenitor y mejoraría la expresión de los factores de transcripción ventricular temprana, tales como Nkx2-5. En cambio, Tbx18
10 redujo el nivel de transcripción de Nkx2-5 (figura 21), lo que concuerda con la conversión a células marcapasos maduras, pero no con la reversión a un estado fetal. En tercer lugar, si la automaticidad de novo de Tbx18-NRVMS fuera una consecuencia de la desdiferenciación a un estado embrionario/fetal, se esperaría que el índice proliferativo de esas células aumentara. Esto se debe a que el ventrículo embrionario crece por hiperplasia, una habilidad que se desploma después del nacimiento. Por el contrario, la expresión de fosfohistona 3 (H3P, un marcador celular activo mitótico) y la incorporación de EdU (un análogo de BrdU, un marcador para la mitosis y la síntesis de ADN naciente) fueron comparables en Tbx18- y GFP-NRVMS (n=3, Figura 5D). Finalmente, se espera que la reversión a un estado
15 embrionario requiera cambios epigenéticos extensos. La investigación de 84 genes relacionados con la remodelación de la cromatina identificó solo diferencias globales menores entre Tbx18-NRVMS y GFP-NRVMS (figura 5E-H). Además, la expresión de investigación de 84 genes relacionados con la raíz verificó que los Tbx18-NRVMS permanecieron diferenciados sin un aumento discernible en los factores de vástagos 2-4 días después de la transducción (figura 10A). Estos hallazgos contrastaron marcadamente con el aumento de vástagos y la
20 diferenciación disminuida observada en las células madre pluripotentes inducidas en relación con sus fibroblastos dérmicos originales (figura 10B). A la luz de los cambios epigenéticos específicos relacionados con el gen (figura 4C), se concluyó que la actividad de marcapasos de novo en Tbx18-NRVMS surge de la reprogramación somática directa sin desdiferenciación a un estado progenitor. Los cambios de pliegue en genes específicos se representan como gráficos de barras para Tbx18 (con respecto a GFP) e iPSCs (con respecto a fibroblastos originales) en la figura 10C y la figura 10D, respectivamente. Se apreciará que, en varias realizaciones, podría usarse Shox2 en lugar de o en conjunción con Tbx18. En varias realizaciones, se seleccionarán uno o más de los siguientes factores de transcripción para usar para lograr la transdiferenciación: Tbx18, Shox2, Tbx3 y Tbx5.

30 A partir de estos datos, se apreciará que, en varias realizaciones, las células quiescentes se diferenciarán por transducción a las células iSAN sin desdiferenciarse primero a un estado embrionario/fetal. De este modo, en varias realizaciones, las células iSAN pueden presentar una morfología similar a la de las células SAN nativas consistentes con la conversión de células quiescentes a células iSAN sin desdiferenciación. Asimismo, en varias realizaciones, la expresión de ANP y α SkA se suprimirá en las células iSAN. Adicionalmente, en varias realizaciones, las células
35 iSAN pueden mostrar niveles de transcripción de Nkx2.5 similares a los de las células marcapasos nativas maduras. En varias realizaciones, las células iSAN permanecerán diferenciadas sin ningún aumento discernible en los factores de vástago. En varias realizaciones, esta transdiferenciación puede ocurrir in vitro, mientras que en otras realizaciones esta transdiferenciación puede ocurrir in vivo. En varias realizaciones, las células quiescentes serán mamíferas, incluyendo varias realizaciones en las que la célula inactiva es humana.

40 Ejemplo 4: diferenciación de células madre embrionarias usando Shox2 a un fenotipo de marcapasos

Las células madre embrionarias pueden diferenciarse espontáneamente en agregados heterogéneos de cardiomiocitos con propiedades auriculares, ventriculares y de marcapasos. De este modo, se realizaron experimentos para comprobar si las células madre embrionarias podían estar sesgadas desde la cardiogénesis aleatoria hacia un fenotipo de marcapasos dominante. Shox2 es un factor de transcripción embrionario esencial para
45 el diseño de las células marcapasos en el nódulo sinoauricular. Usando la sobreexpresión de Shox2, el programa de desarrollo para las células madre embrionarias se inclinó y dominó hacia los miocitos marcapasos. Se apreciará que, en varias realizaciones, Tbx18 se podría usar en lugar de o en conjugación con Shox2. En varias realizaciones, uno o más de los siguientes factores de transcripción se podrían seleccionar para su uso: Tbx18, Shox2, Tbx3 y Tbx5.

Resultados:

50 Se cultivaron células madre embrionarias de ratón en una capa de alimentación de MEFs. La formación del cuerpo embriode se cultivó usando métodos establecidos de cultivo de gota pendiente. El día 3, se realizó el cultivo de cuerpos embrioides. El día 6, se realizó la siembra en placas de cuerpos embrioides en placas de cultivo tisular (figura 11).

55 Se midieron los niveles endógenos del ARN del factor de transcripción en varios puntos de tiempo. Como se muestra en la figura 12, los niveles endógenos de ARN de Tbx18 aumentaron bruscamente tras la formación de los cuerpos embrioides y se nivelaron después de la siembra en placas de los cuerpos embrioides. Sin embargo, el ARN de Tbx3 endógeno disminuyó en relación con las células madre embrionarias de ratón. La figura 13 muestra la administración de vectores de expresión Shox2. Como se muestra en el gráfico en 13B, el nivel de ARNm en relación con las células madre embrionarias de ratón control aumentó después de la tercera administración de vector Shox2 a niveles más altos que las células madre embrionarias de ratón de control.

La sobreexpresión transitoria de Shox2 en células madre embrionarias aumentó la cantidad de cuerpos embrioides de latido espontáneo en 8 veces ($80\pm 27\%$) en comparación con el control ($9\pm 6\%$) (figura 14A). Dentro de cada cuerpo embriode de latido, se encontraron dos focos de latido (2.1 ± 0.8 por cuerpo embriode) en los cuerpos Shox2-embrioides en comparación con el control (1.0 ± 0.6 por cuerpo embriode) (figura 14B). El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1) y HCN4 son importantes para la electrofisiología de los marcapasos. Como se muestra en la figura 15, el nivel de proteína de HCN4 estaba regulado positivamente en todas las etapas de diferenciación, con expresión aumentada de la superficie celular en cuerpos Shox2-embrioides. La obtención de imágenes confocales en la figura 16 también muestra un aumento en la expresión de HCN4 en relación con las células control de GFP. El nivel de proteína NCX1 aumentó > 6 veces en cuerpos Shox2-embrioides en comparación con el control en las etapas temprana y tardía de diferenciación (figura 17). Este nivel comenzó a disminuir y el día 14 después de la última administración del gen Shox2, el NCX1 fue 1.4 veces mayor que el control. Los potenciales de acción se propagan principalmente por conexina (Cx)45 pero no Cx43 en el nodo sinoauricular, que se refleja en el miocardio auricular/ventricular, la sobreexpresión de Shox2 condujo a un aumento en los niveles de transcripción (~ 1.5 veces) y proteína (-3 veces) de Cx45. Por el contrario, los niveles de transcripción y proteína Cx43 se redujeron en cuerpos de embrioides Shox2 en $33\pm 5\%$ y $30\pm 10\%$, respectivamente, en comparación con el control (figura 20). Esta disminución en la transcripción de Cx43 se mantuvo por debajo del control durante el período de tiempo de 14 días del experimento (figura 21A). Por el contrario, Cx45 permaneció aumentado con respecto al control hasta el día 14, con una disminución en el día 7 después de la administración del vector Shox2 (figura 21B). El nivel aumentado de expresión de HCN4 y Cx45 también es evidente a partir de imágenes confocales de células que se transdujeron (figura 22). La expresión de Shox2 después de la transfección también permaneció a niveles elevados con respecto a las células de control transfectadas con HMBS y GFP (figura 23). El ARNm de hShox2 disminuyó después de la transducción del gen Shox2, que finalmente cayó por debajo del nivel de las células de control. Los niveles de ARNm de Tbx18 y Tbx3 en relación con HMBS se muestran en la figura 24. Estos datos sugieren que Shox2 exógeno indujo un aumento en Shox2 endógeno que dio lugar a cambios de expresión en una variedad de genes que sugieren la generación de marcapasos. Por ejemplo, se sabe que HCN4 es importante para la función de marcapasos y su regulación positiva de las células transducidas indica que i) están tomando características de marcapasos debido a Shox2 y/o, ii) pueden ser útiles como células marcapasos biológicas (por ejemplo, células trasplantadas). Además, la regulación positiva de Cx45, que es principalmente responsable de la propagación de los potenciales de acción, indica que estas células madre transducidas por Shox2 estaban sesgadas en su diferenciación hacia un linaje de marcapasos. Como tales, estos datos indican que Shox2 (solo, como se prueba en este documento, o en combinación con otros factores de transcripción, por ejemplo, Tbx18) son útiles en la generación in vivo y/o in vitro de células marcapasos biológicas.

La sobreexpresión de Shox2 predispone la diferenciación de células madre embrionarias singularmente hacia más células marcapasos, expresión aumentada de NCX1, HCN4, Cx45 y Cx43 regulado negativamente. Todas estas características son marcas distintivas de la biología de células nodales SA. En varias realizaciones, se seleccionarán uno o más de los siguientes factores de transcripción para usar en la diferenciación de células madre embrionarias: Tbx18, Shox2, Tbx3 y Tbx5. Además, se apreciará que el uso de células madre multipotentes y/u otras células madre pluripotentes también proporcionará marcas distintivas de la biología de la célula ganglionar y/o la función del marcapasos cuando se contacta con uno o más de los factores de transcripción descritos en este documento. Los datos proporcionan una plataforma novedosa y eficiente para desarrollar marcapasos biológicos a partir de células pluripotentes.

Ejemplo 5: la automaticidad de novo responde a la regulación autonómica in vitro y en el corazón perfundido intacto

Las células marcapasos SAN responden a las entradas autónomas con tasas de activación alteradas. Para evaluar las respuestas adrenérgicas y muscarínicas en células iSAN, Tbx18 y GFP-NRVMS se sembraron en placas en matrices multielectrodo (MEA) para hacer el registro de potenciales de campo extracelulares de células de latido espontáneo (figura 25A). La estimulación beta-adrenérgica (con isoproterenol $1 \mu\text{M}$) aumentó las tasas de activación de Tbx18-NRVMS de 101 ± 30 bpm a 183 ± 44 bpm ($n = 12$, $p < 0.05$). La exposición posterior a un agonista colinérgico, acetilcolina ($1 \mu\text{M}$), suprimió la velocidad a 69 ± 33 bpm ($n = 12$, $p < 0.05$, figura 25B, C). En contraste, los GFP-NRVM presentaron una velocidad de latido espontáneo muy lenta que cambió poco con isoproterenol o acetilcolina (figura 25B, C). La inmunotinción confirmó la expresión prominente de los receptores β -adrenérgicos y el receptor muscarínico tipo 2 en Tbx18-NRVMS (figura 25D). De este modo, Tbx18-NRVMS responden apropiadamente a los estímulos adrenérgicos y muscarínicos.

Se creó un modelo de enfermedad del bloqueo auriculoventricular (AV), que es una indicación común para la colocación de un marcapasos electrónico, para investigar la regulación autónoma de marcapasos biológicos inducidos en el corazón intacto. Los registros electrocardiográficos de los corazones palpitantes, perfundidos ex vivo (figura 28), revelaron latidos ventriculares ectópicos en 8 de 8 corazones inyectados con Tbx18, a una velocidad de 154 ± 6 bpm. La polaridad y morfología de los latidos ectópicos fue idéntica a la de los latidos estimulados por electrodos en la ubicación de la inyección transgénica (figura 25E), que vincula el origen de los latidos ectópicos con el sitio de la transducción de Tbx18. Por el contrario, la mayoría de los corazones de control mostraron un ritmo de escape de unión del QRS estrecho a una velocidad promedio de 120 ± 7 bpm ($n = 7/10$), que se originó en el extremo opuesto del ventrículo (figura 25F). Los corazones inyectados con Tbx18 respondieron bien a la regulación autonómica; La estimulación β -adrenérgica seguida de supresión colinérgica aumentó y luego disminuyó la

frecuencia cardíaca a 235 ± 19 y luego a 150 ± 23 bpm, respectivamente ($n = 7$, Figura 25G). Colectivamente, los datos demuestran que las células Tbx18-NRVMs responden a la regulación autonómica in vitro y en el corazón intacto con la cronotropía apropiada.

5 Se debe apreciar que, en varias realizaciones, podría usarse Shox2 en lugar de o en conjugación con Tbx18. En varias realizaciones, uno o más de los siguientes factores de transcripción se podrían seleccionar para su uso: Tbx18, Shox2, Tbx3 y Tbx5. En varias realizaciones, las células iSAN pueden generar latidos ventriculares ectópicos. En varias realizaciones, las células Tbx18-NRVMs (células iSAN) pueden responder a la regulación autónoma para alterar los latidos ectópicos de estimulación de una manera sustancialmente similar a las células SAN naturales. De este modo, en varias realizaciones, las células iSAN responderán a la regulación autónoma tal como la estimulación β -adrenérgica y la supresión colinérgica in vivo. En varias otras realizaciones, las células iSAN convertidas a partir de células quiescentes in vitro pueden ser capaces de responder a la regulación autónoma. En varias realizaciones, las células iSAN pueden generar pulsaciones ectópicas a un ritmo controlado por regulación autónoma. Se debe apreciar que en varias realizaciones en las que las células iSAN responden a la regulación autónoma, las células iSAN pueden funcionar para tratar una arritmia cardíaca en un paciente que padece dicha arritmia. En varias realizaciones, las células iSAN que responden a la regulación autónoma pueden reemplazar o complementar dispositivos electrónicos de marcapasos en un paciente.

Ejemplo 6: El fenotipo de marcapasos inducido no depende de la expresión continua de la transcripción de Tbx 18

20 Las células reprogramadas permanecen alteradas sin expresión de factor de transcripción sostenida. Con el fin de investigar la persistencia del fenotipo SAN, las Tbx18-VMs se aislaron 6-8 semanas después de la transferencia génica inicial in vivo, y los niveles de transcripción de Tbx18 se cuantificaron mediante RT-PCR cuantitativa de una sola célula. Las transcripciones de Tbx18 presentaron un amplio rango de detección dinámica en Tbx18-VMs aisladas solo 3 días después de la transferencia génica in vivo (figura 26A, panel inferior). Para examinar la durabilidad de la conversión a las células marcapasos tipo SAN, se examinaron 5 miocitos ventriculares de latido espontáneo (114 ± 10 bpm, identificados mediante grabación de video de células vivas o parche-pinza de células enteras) aislados 6-8 semanas después de la transferencia génica in vivo. Los conjuntos de cebadores de PCR se diseñaron para detectar Tbx18, troponina T cardíaca (TnT2, para verificar la identidad de los cardiomiocitos) y GAPDH. Los niveles de transcripción de Tbx18 en 4 de los 5 miocitos de latido espontáneo fueron insignificantes (figura 26B, célula 1, 2, 3 y 4, panel inferior), cerca del nivel de control negativo (figura 26C) en miocitos ventriculares que expresan GFP solo. Tomando la proporción entre la longitud y el ancho de la célula (L-a-W) como el criterio, se examinó el porcentaje de Tbx18-VMs similares a SAN (células iSAN) hasta seis semanas después de la transferencia génica inicial. Una proporción significativa de células iSAN persiste, aunque el porcentaje tiende a disminuir con el tiempo (figura 9C). Por lo tanto, en varias realizaciones, los efectos positivos persistentes debidos a la administración de células iSAN (por ejemplo, para tratar la arritmia cardíaca) persisten durante un período de tiempo prolongado después de la administración. Por ejemplo, en varias realizaciones, los efectos duran desde aproximadamente 2 a aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 3 a aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 4 a aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 5 a aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 6 a aproximadamente 8 semanas, después de la administración, y los intervalos superpuestos del mismo. En varias realizaciones, se realizan periodos de persistencia más largos, dependiendo de la realización.

40 Se examinó la persistencia del fenotipo de marcapasos inducido más allá de los primeros días de transducción usando el modelo de bloque AV perfusionado de corazón intacto. Tres a cuatro semanas después de la transferencia génica, los corazones inyectados con Tbx18 demostraron ritmo idioventricular ectópico a 165 ± 14 bpm ($n = 3/3$, figura 29A), con electrocardiogramas consistentes con estimulación biológica del sitio de inyección de Tbx18 (figura 29B). Además, estos corazones respondieron a la regulación autonómica (figura 29C) de forma similar a los corazones inyectados con Tbx18 a corto plazo (figura 25G). Tomados en conjunto, los datos indican que las células tipo SAN mantienen la función del marcapasos incluso después de que la expresión exógena de Tbx18 ha disminuido, lo que indica una reprogramación genuina.

50 A partir de estos datos, debe apreciarse que en varias realizaciones las células iSAN no continuarán expresando Tbx18 después de la conversión de células quiescentes a células similares a marcapasos. De este modo, en varias realizaciones, debe apreciarse que una administración única de Tbx18 a las células quiescentes puede ser suficiente para convertir las células quiescentes en células iSAN y para que las células iSAN mantengan su función de marcapasos durante un período de al menos 6-8 semanas in vivo incluso si la expresión de Tbx18 disminuye en las células iSAN. En algunas realizaciones, este período durante el cual las células iSAN convertidas mantienen la función de marcapasos podría ser un período de menos de 6 semanas. En algunas realizaciones, este período podría ser un período de más de 8 semanas. En algunas realizaciones, puede administrarse más de una administración de transcrito de Tbx18 a las células quiescentes. Además, debe apreciarse que, en varias realizaciones, podría usarse Shox2 en lugar de o en conjugación con Tbx18. En varias realizaciones, uno o más de los siguientes factores de transcripción se podrían seleccionar para su uso: Tbx18, Shox2, Tbx3 y Tbx5 y/o fragmentos funcionales o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la administración del factor de transcripción o factores de transcripción podría ocurrir in vitro. Se apreciará que en varias realizaciones la capacidad de la célula iSAN para generar un ritmo ectópico después de la expresión de Tbx18 en la célula iSAN ha disminuido,

indica que la célula iSAN puede ser apropiada para reemplazar o complementar un marcapasos electrónico en un sujeto con una arritmia cardiaca o actuar para tratar dicha arritmia cardiaca en dicho sujeto.

5 Aunque las realizaciones de las invenciones se han descrito en el contexto de ciertas realizaciones preferidas y ejemplos, los expertos en el arte entenderán que la presente invención se extiende más allá de las realizaciones descritas específicamente a otras realizaciones alternativas y/o usos de las invenciones y modificaciones obvias y equivalentes de las mismas. Además, aunque se han mostrado y descrito en detalle varias variaciones de las
10 invenciones, otras modificaciones, que están dentro del alcance de la invención, serán fácilmente evidentes para los expertos en el arte en base a esta divulgación. También se contempla que se pueden hacer diversas combinaciones o subcombinaciones de las características y aspectos específicos de las realizaciones y que aún estén dentro de una o más de las invenciones. Además, la divulgación en este documento de cualquier característica particular, aspecto, método, propiedad, característica, calidad, atributo, elemento o similar en conexión con una realización se puede usar en todas las demás realizaciones expuestas en este documento. De acuerdo con lo anterior, se debe
15 entender que diversas características y aspectos de las realizaciones descritas se pueden combinar o sustituir entre sí con el fin de formar modos variables de las invenciones descritas. Para todas las realizaciones descritas en este documento, las etapas de los métodos no necesitan realizarse secuencialmente. De este modo, se pretende que el alcance de las invenciones en este documento descritas no esté limitado por las realizaciones descritas particulares descritas anteriormente.

SEQ ID No. 1 - Homo sapiens T-box 3 (TBX3), variante de transcripción 1, ARNm Número de acceso - NM_005996.3

GAATTCTAGAGGCGGCGGAGGGTGGCGAGGAGCTCTCGCTTTCTCTCGCTCCCTCCCTCTCCGACTCCGTCTCTC
TCTCTCTCTCTCTCTCTCCCTCCCTCTCTTTCCCTCTGTTCCATTTTTTCCCCCTCTAAATCCCTCCCTGCOCTG
CGCGCTGGACACAGATTTAGGAAGCGAATTCGCTCACGTTTTTAGGACAAGGAAGAGAGAGAGGACGGGAGAAG
AGCCCAGCAAGATTTGGATTGAAACCGAGACACCCTCCGGAGGCTCGGAGCAGAGGAAGGAGGAGGGCGGGCG
AACGGAAGCCAGTTTGCAATTCAGTTTTGATAGCGCTGGTAGAAGGGGGTTTTAAATCAGATTTTTTTTTTTTA
AAGGAGAGAGACTTTTTCCGCTCTCTCGCTCCCTGTTAAAGCCGGTCTAGCACAGCTGCAGACGCCACCAGCGA
GAAAGAGGGAGAGGAAGACAGATAGGGGGCGGGGAAGAAGAAAAAGAAAGTAAAAAGTCTTCTAGGAGAACCT
TTCACATTTGCAACAAAAGACCTAGGGGCTGGAGAGAGATTCCTGGGACGCAGGGCTGGAGTGTCTATTTGAGC
TCAGCGGCAGGGCTCGGGCGCGAGTCGAGACCCTGCTCGCTCCTCTCGCTTCTGAAACCGACGTTCCAGGAGCGGC
TTTTTAAAAACGCAAGGCACAAGGACGGTCACCCGCGCGACTATGTTTGCTGATTTTTCGCCTTGCCCTCTTTAA
AAGCGGCTCCCATTTCTCAAAAAGACACTTCCCTCCTCCCTTTGAAGTGCATTAGTTGTGATTTCTGCCTCCTT
TTCTTTTTTCTTTCTTTTTTGTITTTGCTTTTTCCCCCTTTTGAATTATGTGCTGCTGTTAAACAACAACAAAA
AACAAACAAAACACAGCAGCTGCGGACTTGTCCCGGCTGGAGCCCAGCGCCCCGCTGGAGTGGATGAGCCTCTC
CATGAGAGATCCGGTCATTCTCTGGGACAAGCATGGCCTACCATCCGTTCTACCTCACCGGGCGCCGGACTTCGC
CATGAGCGCGGTGTCTGGGTCAACAGCCGCGCTTCTTCCCGCGCTGACGCTGCCTCCCAACGGCGGGCGGGCT
CTCGCTGCCGGGGCCCTGGCCAAGCCGATCATGGATCAATTGGTGGGGCGGCGGAGACCGGCATCCCGTTCTC
CTCCCTGGGGCCCCAGGCGCATCTGAGGCCTTTGAAGACCATGGAGCCCGAAGAAGAGGTGGAGACGACCCCAA
GGTGCACCTGGAGGCTAAAGAACTTTGGGATCAGTTTCAACAAGCGGGGCACCGAGATGGTCATTACCAAGTCGGG
AAGGCGAATGTTTCTCCATTTAAAGTGAATGTTCTGGGCTGGATAAAAAAGCCAAATACATTTTATGATGGA
CATTATAGCTGCTGATGACTGTGTTATAAATTTACAATTTCTCGGTGGATGGTGGCTGGTAAGGCCGACCCCGA
AATGCCAAAGAGGATGTACATTCACCCGACAGCCCCGCTACTGGGGAACAGTGGATGTCCAAAGTCGTCACTTT
CCACAAACTGAAACTCACCAACAACATTTAGACAAAACATGGATTTACTATATTGAACTCCATGCACAAATACCA
GCCCCGGTTCACATTTGTAAGAGCCAATGACATCTTGAAACTCCCTTATAGTACATTTCCGACATACTGTTCCTC
CGAAACTGAATTCATCGCTGTGACTGCATACCAGAATGATAAGATAAACCAGTTAAAAATAGACAACAACCTTT
TGCAAAAGGTTTCCGGGACACTGGAAATGGCCGAAGAGAAAAAGAAAAAGAAACAGCTCACCTGCAGTCCATGAGGGT
GTTTGATGAAAGACACAAAAAGGAGAATGGGACCTCTGATGAGTCTCCAGTGAACAAGCAGCTTTCAACTGCTT
CGCCCAGGCTTCTTCTCCAGCCGCTCCACTGTAGGGACATCGAACCTCAAAGATTTATGTCCCAGCGAGGGTGA
GAGCGACGCCGAGGCCGAGAGCAAAGAGGAGCATGGCCCCGAGGCTGCGACGCGGCCAAGATCTCCACCACCAC
GTCGGAGGAGCCCTGCCGTGACAAGGGCAGCCCCGCGGTCAAGGCTCACCTTTTCGCTGCTGAGCGCCCCGGGA
CAGCGGGCGGCTGGACAAAGCGTCGCCCCGACTCACGCCATAGCCCCGCCACCATCTCGTCCAGCACTCGCGGCT
GGGCGCGGAGGAGCGCAGGAGCCCCGTTTCGCGAGGGCACAGCGCCGGCCAAGGTGGAAGAGGCGCGCGCTCCC
GGGCAAGGAGGCTTCGCGCGGCTCACGGTGCAGACGGACGCGGCCGCCGCGCACCTGGCCCAGGGCCCCCTGCC
TGGCCTCGGCTTCGCCCGGGCCTGGCGGGCAACAGTTCTTCAACGGGCACCCGCTCTTCTGCACCCCAGCCA
GTTTGCCATGGGGGGCGCTTCTCCAGCATGGCGGCCGCTGGCATGGGTCCCCTCCTGGCCACGGTTTCTGGGGC
CTCCACCGGTGTCTCGGGCCTGGATTCCACGGCATGGCCTCTGCCGCTGCGGGCGAGGGACTGTCGGGGCGCTC
CGCGGCCACCCTGCCCTTCCACCTCCAGCAGCACGTCTGGCCTCTCAGGGCCTGGCCATGTCCCCTTTCGGAAG
CCTGTTCCCTTACCCCTACACGTACATGGCCGAGCGGGCGGCCCTCCTCTGCGGCAGCCTCCAGCTCGGTGCA

ES 2 685 319 T3

CCGCCACCCCTTCCTCAATCTGAACACCATGCGCCCGCGGCTGCGCTACAGCCCTACTCCATCCCGGTGCCGGT
CCCGGACGGCAGCAGTCTGCTCACCACCGCCCTGCCCTCCATGGCGGGCGCCCGGGGGCCCTGGACGGCAAAGT
CGCCGCCCTGGCCGCCAGCCCGGCCCTCGGTGGCAGTGGACTCGGGCTCTGAACTCAACAGCCGCTCCTCCACGCT
CTCCTCCAGCTCCATGTCCTTGTGCGCCAAACTCTGCGCGGAGAAAGAGCGGCCACCAGCGAACTGCAGAGCAT
CCAGCGGTTGGTTAGCGGCTTGGAAAGCCAAGCCGGACAGGTCCCGCAGCGCGTCCCGGTAGACCCGTCCCAGACA
CGTCTTTTCATTCCAGTCCAGTTCAGGCTGCCGTGCACTTTGTGCGGATATAAAATAAACCACGGGCCCGCCATGG
CGTTAGCCCTTCCTTTTGCAGTTGCGTCTGGGAAGGGGGCCCGGACTCCCTCGAGAGAATGTGCTAGAGACAGCC
CCTGTCTTCTTGGCGTGGTTTATATGTCCGGGATCTGGATCAGATTCTGGGGGCTCAGAAACGTCGGTTGCATTG
AGTACTGGGGGTAGGAGTCCAACATTTATGTCCAGAGCAACTCCAGCAAGGCTGGTCTGGGTCTCTGCCAC
CAGGCGGGGAGGTGTTCAAAGACATCTCCCTCAGTGCAGATTATATATATATATTTTCCCTTCACTGTGTCAGTG
GAAACAAAAACAAATCTTTCAAAAAAAAAAATCGGGACAAGTGAAACACATTAACATGATTCTGTTTGTGCAGATT
AAAAACTTTATAGGGACTTGCATTATCGGTTCTCAATAAATTACTGAGCAGCTTTGTTTGGGGAGGGAAGTCCCT
ACCATCCTTGTITAGTCTATATTAAGAAAATCTGTGTCTTTTTAATATTCTTGTGATGTTTTAGAGCCGCTGTA
GGTCTCTTCTTGCATGTCCACAGTAATGTATTTGTGGTTTTTATTTTGAACGCTTGCTTTTAGAGAGAAAAACAAT
ATAGCCCCCTACCCTTTTCCCAATCCTTTGCCCTCAAATCAGTGACCCAAGGGAGGGGGGATTTAAAGGGAAGG
AGTGGGCAAAACACATAAAATGAATTTATATATCTAAGCTCTGTAGCAGGATTCATGTCGTTCTTTGACAGTTC
TTCTCTTTCTGTATATGCAATAACAAGGTTTTAAAAAATAATAAAGAAGTGAGACTATTAGACAAAGTATTT
ATGTAATATTTGATAACTCTTGIAAATAGGTGGAATATGAATGCTTGGAAAATTAACCTTTAATTTATTGACAT
TGTACATAGCTCTGTGIAAATAGAATTGCAACTGTCAGGTTTTGTGTTCTTGTTTTCTTTAGTTGGGTTTATTT
CCAGGTCACAGAATTGCTGTTAACACTAGAAAACACACTTCTGCACCAACACCAATACCCTTTCAAAGAGTGTG
TCTGCAACATTTTTGTTTTCTTTTTAATGTCCAAAAGTGGGGGAAAGTGCTATTTCTATTTTACCACAAATG
GGGAAGGAGTGCCACTTTCCAGCTCCACTTCAAATTCCTTAAATATAACTGAGATTGCTGTGGGGAGGGAGGAG
GGCAGAGGCTGCGGTTTACTTTTTAATTTTTCTTTTGTATTGCTAGTCTCTGATTTCTCAAACG
AAGTGGAAATTTACTACTGTTGTCAGTATCGGTGTTTTGAATTGGTGCCTGCCTATAGAGATATATTCACAGTTCA
AAAGTCAGGTGCTGAGAGATGGTTTTAAAGACAAATTCATGAAGGTATATTTGTGTTATAGTTGTTGATGAGTTC
TTGGTTTTCTGTATTTTTCCCCCTCTCTTTAAAACATCACTGAAATTTCAATAAATTTTTATTGAAATGTCTAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID. No. 2 - Homo sapiens T-box 3 (TBX3), variante de transcripción 2, ARNm Número de acceso - NM_016569.3

GAATTCTAGAGCGGGCGGAGGGTGGCGAGGAGCTCTCGCTTTCTCTCGCTCCCTCCCTCTCCGACTCCGTCTCTC
TCTCTCTCTCTCTCTCTCCCTCCCTCTCTTTCCCTCTGTTCCATTTTTTCCCCCTCTAAATCCTCCCTGCCCTG
CGCGCCTGGACACAGATTTAGGAAGCGAATTCGCTCACGTTTTAGGACAAGGAAGAGAGAGAGGSCACGGGAGAAG
AGCCCAGCAAGATTTGGATTGAAACCGAGACACCCTCCGGAGGCTCGGAGCAGAGGAAGGAGGAGGGCGGGC
AACGGAAGCCAGTTTGCAATTCAGTTTTGATAGCGCTGGTAGAAGGGGGTTTTAAATCAGATTTTTTTTTTTTA
AAGGAGAGAGACTTTTTCCGCTCTCTCGCTCCCTGTTAAAGCCGGGTCTAGCACAGCTGCAGACGCCACCAGCGA
GAAAGAGGGAGAGGAAGACAGATAGGGGGCGGGGGAAGAAGAAAAAGAAAGGTAAAAAGTCTTCTAGGAGAACCT
TTCACATTTGCAACAAAAGACCTAGGGGCTGGAGAGAGATTCTGGGACGCAGGGCTGGAGTGTCTATTTGAGC
TCAGCGGCAGGGCTCGGGCGGAGTCGAGACCCTGCTCGCTCCTCTCGCTTCTGAAACCGACGTTCCAGGAGCGGC
TTTTTAAAAACGCAAGGCACAAGGACGGTCACCCGCGCGACTATGTTTGCTGATTTTTCGCCTTGCCCTCTTTAA
AAGCGGCTCCCATTTCTCCAAAAGACACTTCCCTCCTCCCTTTGAAGTGCATTAGTTGTGATTTCTGCCCTCCTT
TTCTTTTTTCTTTCTTTTTTGTTTTGCTTTTTTCCCCCTTTTGAATTATGTGCTGCTGTTAAACAACAACAAAA
AACAAACAAAACACAGCAGCTGCGGACTTGTCCCGGCTGGAGCCCAGCGCCCGCCTGGAGTGGATGAGCCTCTC
CATGAGAGATCCGGTCATTCCTGGGACAAGCATGGCCACCATCCGTTCCCTACCTCACCGGGCGCCGGACTTCGC
CATGAGCGCGGTGCTGGGTCAACAGCCCGCTTCTTCCCGCGCTGACGCTGCCTCCCAACGGCGCGGGCGGCGCT
CTCGCTGCCGGGCGCCCTGGCCAAGCCGATCATGGATCAATTTGGTGGGGCGGGCCGAGACCAGGCATCCCGTTCTC
CTCCCTGGGGCCCCAGGCGCATCTGAGGCCTTTGAAGACCATGGAGCCCAGAGAAGAGGTGGAGGACGACCCCAA
GGTGCACCTGGAGGCTAAAGAACTTTGGGATCAGTTTACAAGCGGGGCACCGAGATGGTCATTACCAAGTCGGG
AAGGCGAATGTTTCCCTCCATTTAAAGTGAGATGTTCTGGGCTGGATAAAAAAGCCAAATACATTTTATTGATGGA
CATTATAGCTGCTGATGACTGTCTGTTATAAATTTACAATTTCTCGGTGGATGGTGGCTGGTAAGGCCGACCCCGA
AATGCCAAAGAGGATGTACATTCACCCGACAGCCCCGCTACTGGGGAACAGTGGATGTCCAAAGTCGTCACTTT
CCACAACTGAAACTACCAACAACATTTAGACAAACATGGATTTACTTTGGCCTTCCCAAGTGATCACGCTAC
GTGGCAGGGGAATTATAGTTTTGGTACTCAGACTATATTGAACTCCATGCACAAATACCAGCCCCGGTTCCACAT
TGTAAGAGCCAATGACATCTTGAAACTCCCTTATAGTACATTTCCGACATACTTGTTCCCGAAACTGAATTCAT
CGCTGTGACTGCATAACCAGAATGATAAGATAACCCAGTTAAAAATAGACAACAACCCTTTTGCAAAAAGGTTTCCG
GGACACTGGAAATGGCCGAAGAGAAAAAGAAAACAGCTCACCTGCAGTCCATGAGGGTGTGTTGATGAAAGACA
CAAAAAGGAGAAATGGGACCTCTGATGAGTCTCCAGTGAACAAGCAGCTTTCAACTGCTTCGCCAGGCTTCTTC
TCCAGCCGCTCCACTGTAGGGACATCGAACCTCAAAGATTTATGTCCAGCGAGGGTGAGAGCGACGCCGAGGC
CGAGAGCAAAGAGGAGCATGGCCCCGAGGCTGCGACCGGCCAAGATCTCCACCACCACGTCGGAGGAGCCCTG
CCGTGACAAGGGCAGCCCCGCGGTCAAGGCTCACCTTTTCGCTGCTGAGCGGCCCCGGGACAGCGGGCGGCTGGA
CAAAGCGTCGCCGACTCACGCCATAGCCCCGCCACCATCTCGTCCAGCACTCGCGGCTGGGCGCGGAGGAGCG
CAGGAGCCCCGTTCGCGAGGGCACAGCGCCGCCAAGGTGGAAGAGGGCGCGCGCTCCCGGGCAAGGAGGCCTT
CGCGCCGCTCACGGTGCAGACGGACCGGCCCGCCGCACTGGCCAGGGCCCCCTGCCTGGCCTCGGCTTCGC
CCCAGGCTGGCGGGCCAAAGTCTTCAACGGGCACCCGCTCTTCTGCACCCCAGCCAGTTTGGCATGGGGGG
CGCCTTCTCCAGCATGGCGGCCGCTGGCATGGGTCCCTCCTGGCCACGTTTTCTGGGGCTCCACCGGTGTCTC
GGGCTGGATTCACGGCCATGGCCTCTGCCGCTGCGGCGCAGGGACTGTCCGGGGCGTCCGCGGCCACCCTGCC
CTTCCACCTCCAGCAGCAGTCTTGGCCTCTCAGGCTGGCCATGTCCCTTTTGGAAAGCCTGTTCCTTACCC
CTACACGTACATGGCCGAGCGGGCGCCGCTCCTCTGCGGCAGCCTCCAGCTCGGTGCACCGCCACCCTTCT

CAATCTGAACACCATGCGCCCGCGGCTGCGCTACAGCCCCTACTCCATCCCAGGTGCCGGTCCCAGGACGGCAGCAG
TCTGCTCACCACCGCCCTGCCCTCCATGGCGGGCGGCCGCGGGGCCCTGGACGGCAAAGTCGCCGCCCTGGCCGC
CAGCCCGGCCTCGGTGGCAGTGGACTCGGGCTCTGAACTCAACAGCCGCTCCTCCACGCTCTCCTCCAGCTCCAT
GTCCTTGTCGCCCAAACCTCTGCGCGGAGAAAGAGGCGGCCACCAGCGAACTGCAGAGCATCCAGCGGTGGTTAG
CGGCTTGGAAGCCAAGCCGGACAGGTCCCAGCAGCGCTCCCGTAGACCCGTCCCAGACACGCTTTTTCAATCCA
GTCCAGTTCAGGCTGCCGTGCACCTTGTTCGGATATAAAAATAAACACAGGGCCCGCCATGGCGTITAGCCCTTCCTT
TTGCAGTTCGGTCTGGGAAGGGGCCCGGACTCCCTCGAGAGAATGTGCTAGAGACAGCCCCTGTCTTCTTGGCG
TGGTTTATATGTCGGGATCTGGATCAGATTCTGGGGGCTCAGAAACGTTCGGTTGCATTGAGCTACTGGGGGTAG
GAGTTCCAACATTTATGTCCAGAGCAACTTCCAGCAAGGCTGGTCTGGGTCTCTGCCACCAGBCGGGAGGTGT
TCAAAGACATCTCCCTCAGTGCAGGATTTATATATATATTTTTCTTCACTGTGTCAAGTGGAAACAAAAACAAAA
TCTTTCAAAAAAAAATCGGGACAAGTGAACACATTAACATGATTCTGTTTGTGCAGATTAAAACTTTATAGGG
ACTTGCATTATCGGTTCTCAATAAATACTGAGCAGCTTTGTTTGGGGAGGGAAGTCCCTACCATCCTTGTITAG
TCTATATTAAGAAAATCTGTGTCTTTTTAATATTCTTGTGATGTTTTAGAGCCGCTGTAGGTCTCTTCTTGCAT
GTCCACAGTAATGTATTTGTGGTTTTTATTTTGAACGCTTGCTTTTAGAGAGAAAACAATATAGCCCCCTACCCT
TTTCCCAATCCTTTGCCCTCAAATCAGTGACCCAAGGGAGGGGGGATTAAAGGGAAGGAGTGGGCAAAACACA
TAAATGAATTTATATATCTAAGCTCTGTAGCAGGATTCATGTGCTTCTTTCAGAGTCTTTCTCTTTCCTGTA
TATGCAATAACAAGGTTTTAAAAAATAATAAAGAAGTGAGACTATTAGACAAAGTATTTATGIAATTTATTTGAT
AACTCTTGTAATAGGTGGAATATGAATGCTTGGAAAATTAACCTTTAATTTATTGACATTGTACATAGCTCTGT
GTAATAGAATTGCAACTGTCAGGTTTTGTGTTCTTGTTCCTTTAGTTGGGTTTTATTTCCAGGTCACAGAATT
GCTGTTAACACTAGAAAACACACTTCCCTGCACCAACACCAATACCCTTTCAAAGAGTGTCTGCAACATTTTTG
TTTTCTTTTTTAATGTCCAAAAGTGGGGAAAGTGCTATTTCCATTTTTCACCAAATGGGGAAAGGAGTGCCAC
TTTCCAGCTCCACTTCAAATTCCTTAAAATATAACTGAGATTGCTGTGGGGAGGGAGGAGGGCAGAGGCTGCGGT
TTGACTTTTTAATTTTTCTTTTGTATTTGTATTTGCTAGTCTCTGATTTCCCTCAAACGAAGTGGAAATTTACTA
CTGTTGTCAGTATCGGTGTTTTGAATTGGTGCCTGCCTATAGAGATATATTACAGTTCAAAGTCAGGTGCTGA
GAGATGGTTTTAAAGACAAATTCATGAAGGTATATTTTGTGTTATAGTTGTTGATGAGTCTTTGGTTTTCTGTAT
TTTTCCCCCTCTCTTTAAAACATCACTGAAATTTCAATAAATTTTTATTGAAATGTCTAAAAAATAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID No. 3 - Homo sapiens T-box 5 (TBX5), variante de transcripción 1, ARNm Número de acceso - NM_000192.3

CCTAAATTCACGTTTCCCCTTGACTAAGAAAAGCACCTACCTCTGCCATGTGATGTTTCTGAAAAGCCTCTGTAT
GTCCCCATTTGCTTTGGTTTTGTCCTGCCTTCTCCAATATCACGTGCTCAGTTTTGCCTCTACTTACCCATGGAG
TCAGGATAACACTGACGCTCCCTGGCATCCTATCTTATTACAGCCCTACCATCTTGCCAGCTCTGTCTTTCCAGCT
GTCTGTGCTAAAACGTGGCCTATAGCTTCCCTTCCGGAAAGCTTGCTTTGAAAAACTTAAAAAGCCCCGTTTA
CATGTAGGCAGGACTGTGATAACAGTGCAAGCTCTGTGTTGACAAGAGTTGTGGACAAAAAGCCAAAAATAATAT
TCTTCTGATTAAAAAATTTTTTTTGAATAAACAAGGCCAGCCCCAACCTTCCAAACCTCCATCACCACAAC
CCAAACTGGATGTCAAGCAAAATGCACAATTCTACAGAAGAGGCAAGACACAGTCACCAATGATATCTCGCCAA
AGAAAACCACGCCACACCAATGCCAACACAAAAGTGTGTTACTGAAAGCCGAAAAACAGTATTAATAAAGTGTG
TAAGTAAAGTGTATGGTAGGGTCTTCAGATGTAATATTTTACTGGTACTATTTATTTATAAATAGGAATTCTA
ATTAAGTAATAACATGAAATGAAACCCAGCATAGGAGCTGGCCAAAGAGCTTTTAATTTTATTGATACTCAAAACC
AAGTTTGTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTTTTCTCTTTTCAATGTGCTTTTGTCTTTTTTTGATTAAAAAGAAT
TTTTTTTTTCTTTTTTATAAACAGACCCTAATAAAGAGAACAGGGTAAAGATGTGAGGCTGAGTGTGTTAAGTA
CGTGAGAGAGTGTGAGTGTGTTGTAAGTGTGAGTGTCCCTATGCGATTATGTCTCTTTACGTGCTAAGGGGGGAG
GGTGAGGATTAAGTACTCGTGCCCTTATATTTGTGTGCCAATTAATGCCTAATAAATACCATGTGCTTAAACAAGT
AA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO. 4 - Homo sapiens T-box 5 (TBX5), variante de transcripción 2, ARNm Número de acceso - NM_080718.1

ATGGCCGACGCAGACGAGGGCTTTGGCCTGGCGCACACGCCTCTGGAGCCTGACGCAAAAGACCTGCCCTGCGAT
TCGAAACCCGAGAGCGCGCTCGGGGCCCCAGCAAGTCCCCGTCGTCCCCGAGGCCGCCTTCACCCAGCAGGGC
ATGGAGGGAATCAAAGTGTTCCTCCATGAAAGAGAAGTGTGGCTAAAATTCACGAAGTGGGCACGGAAATGATC
ATAACCAAGGCTGGAAGGCGGATGTTTCCAGTTACAAAGTGAAGGTGACGGGCCTTAATCCCAAAACGAAGTAC
ATTCTTCTCATGGACATTGTACCTGCCGACGATCACAGATACAAATTCGCAGATAATAAATGGTCTGTGACGGGC
AAAGCTGAGCCCGCCATGCCTGGCCGCTGTACGTGCACCCAGACTCCCCCGCCACCGGGGCGCATTGGATGAGG
CAGCTCGTCTCCTTCCAGAACTCAAGCTCACCAACAACCCTGGACCCATTTGGGCATATTATTCTAAATTC
ATGCACAAATACCAGCCTAGATTACACATCGTGAAAGCGGATGAAAATAATGGATTGGCTCAAAAAATACAGCG
TTCTGCACTCACGTCTTCTGAGACTGCGTTTTATAGCAGTACTTCTACCAGAACCACAAGATCACGCAATTA
AAGATTGAGAATAATCCCTTTGCCAAAGGATTTCCGGGCAGTGATGACATGGAGCTGCACAGAATGTCAAGAATG
CAAAGTAAAGAATATCCCGTGGTCCCCAGGAGCACCGTGAGGCAAAAAGTGGCCTCCAACCACAGTCTTTACAGC
AGCGAGTCTCGAGCTCTCTCACCTCATCCAATTTGGGGTCCCAATACCAGTGTGAGAATGGTGTTCGGCCCC
TCCAGGACCTCCTGCCTCCACCCAACCCATACCCACTGCCCCAGGAGCATAGCCAAATTTACCATTGTACCAAG
AGGAAAGGTGAGTGTGATCACCCCTGGTCAATTTGCTTTCTTTCTTACCTTTTCTTTCTTCTTGGGTTGGGGTGA

5 SEQ ID No. 5 - Homo sapiens T-box 5 (TBX5), variante de transcripción 3, ARNm Número de acceso - NM_080717.21

CATGCCTTATGCAAGAGACCTCAGTCCCCCGGAACAACTCGATTTCCCTTCCAATAGAGGTCTGAGGTGGACTCCC
 ACCTCCCTTCGTGAAGAGTTCCTCCTCTCCCCCTTCCCTAAGAAAAGTCGATCTTGGCTCTATTTGTGTCTTATGT
 TCATCACCCTCATTCTCCGGAGAAAAGCCGGGTTGGTTTATGTCTTTATTTATTTCCCGGGGCCAAGACGTCCGGA
 ACCTGTGGCTGCGCAGACC CGGCACTGATAGGCGAAGACGGAGAGAAAATTTACCTCCCGCCGCTGCCCCCAGCC
 AAACGTGACAGCGCGCGGGCCGGTTGCGTGACTCGTGACGTCTCCAAGTCTATAGGTGCAGCGGCTGGTGAGAT
 AGTCGCTATCGCCTGGTTCCTCTTTATTTTACTGGGGTATGCCTGGTAATAAACAGTAATATTTAATTTGTCCG
 AGACCACAAAACCAACCTTGAGCTGGGAGGTACGTGCTCTTCTTGACAGACGTTGGAAGAAGACCTGGCCTAAAGA
 GGTCTCTTTTGGTGGTCTTTTCAAAGTCTTACCCTGAGCCCTGCTCTCCAGCGAGGCCCACTCTGGCTTTTGC
 GCTCCAAAGAAGAGGTGGGATAGTTGGAGGGCATGGAGGGAATCAAAGTGTTTCTCCATGAAAGAGAAGTGTGGC
 TAAAATTCACGAAAGTGGGCACGGAAATGATCATAACCAAGGCTGGAAGGCGGATGTTTCCAGTTACAAAGTGA
 AGGTGACGGGCTTAATCCCAAAACGAAGTACATTCTTCTCATGGACATGTACCTGCCGACGATCACAGATACA
 AATTCGCAGATAATAAATGGTCTGTGACGGCAAAGCTGAGCCCGCCATGCCTGGCCGCTGTACGTGCACCCAG
 ACTCCCCCGCCACCGGGGCGCATTGGATGAGGCAGCTCGTCTCCTTCCAGAAACTCAAGCTCACCAACAACCACC
 TGGACCCATTTGGGCATATATTTCTAAATTCATGCACAAATACCAGCCTAGATTACACATCGTGAAAGCGGATG
 AAAATAATGGATTTGGCTCAAAAAATACAGCGTTCTGCACTCACGTCTTTCCTGAGACTGCGTTTATAGCAGTGA
 CTTCTACCAGAACCACAAGATCACGCAATTAAGATTGAGAATAATCCCTTTGCCAAAGGATTTCCGGGGCAGTG
 ATGACATGGAGCTGCACAGAATGTCAAGAATGCAAAGTAAAAGAATATCCCGTGGTCCCCAGGAGCACCGTGAGGC
 AAAAAGTGGCCTCAACCACAGTCTTTTTCAGCAGCGAGTCTCGAGCTCTCTCCACCTCATCCAATTTGGGGTCCC
 AATACCAGTGTGAGAATGGTGTTCGGGCCCTCCAGGACCTCCTGCCTCCACCCAAACCATACCCACTGCCCC
 AGGAGCATAGCCAAATTTACCATTGTACCAAGAGGAAAGAGGAAGAATGTTCCACCACAGACCATCCCTATAAGA
 AGCCCTACATGGAGACATCACCCAGTGAAGAAGATTCCTTCTACCGCTCTAGCTATCCACAGCAGCAGGGCCTGG
 GTGCTCCTACAGGACAGAGTGGCAGCAGCGGCAAGCTTGCATGTATGCCAGCTCTGCGCCCCCAGCGAGCCTG
 TGCCAGCCTAGAGGACATCAGCTGCAACACGTGGCCAAAGCATGCCTTCTACAGCAGCTGCACCGTCAACCACG
 TGCAGCCCATGGACAGGCTACCCTACCAGCACTTCTCCGCTCACTTCACTCGGGGCCCTGGTCCCTCGGCTGG
 CTGGCATGGCCAACCATGGCTCCCCACAGCTGGGAGAGGGAATGTTCCAGCACCAGACCTCCGTGGCCACCAGC
 CTGTGGTCAGGCAGTGTGGGCCTCAGACTGGCCTGCAGTCCCTGGCACCTTTCAGCCCCCTGAGTTCTCTACT
 CTCATGGCGTGCCAAGGACTCTATCCCTCATCAGTACCCTCTGTGCACGGAGTTGGCATGGTGCCAGAGTGGGA
 GCGACAATAGCTAAAGTGAAGCCTGCTTCAACACAGACATTTCTAGAGAAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAAGAGA
 GAGAAGGAGAGAGACAGTAGCCAAGAGAACCCACGGACAAGATTTTTCATTTACCCCAATGTTACATCTGCAC
 TCAAGGTGCTGGATGCTGATCTAATCAGTAGCTTGAACCACAATTTTAAAAATGTGACTTTCTTGTTTTGTCT
 CAAAACCTAAAAAACAAACACAAAAAGATGAGTCCCAACCCCACTACCACCACACCCATCAACCAGCCACATT
 CACGCTACTCCCCAGATCTTTCCCCATTCTTCTTTTGGGCTCTAGAAAAGTCTTGCCTCATGAGTGTTTTTC
 CCTAGTGCCTAGTTGGAGTCTGTCCCTGCTTGGTGTAAATGTTGACATIGTTATATAATAAATGATAATATATT
 TTTTCTTTCAATTTTCTTAATGGGACCCAGTCCCTTATTTGGGGGAGGTCTGAGGCAAGTATATTTCAAATA
 TGTACTTGGGGATTCCCTTCAAGTAAACCATCCCTGAAACCTAAATTCACGTTTCCCTTGACTAAGAAAAGCA
 CCTACCTCTGCCATGTGATGTTTCTGAAAAGCCTCTGTATGTCCCAATTGCTTTGGTTTTGTCTGCTTCTCC
 AATATCACGTGCTCAGTTTGCCTCTACTTACCCATGGAGTCAGGATAACACTGACGCTCCCTGGCATCCTATCT

ES 2 685 319 T3

TATTCAGCCCTACCATCTTGCCAGCTCTGTCTTTCCAGCTGTCTGTGCGCTAAAACGIGGCCCTATAGCTTCCCTTC
CGGAAAGCTTGCTTTGAAAACTTAAAAAGCCCCGTTTACATGTAGGCAGGACTGTGATAACAGTGCAAGCTCT
GTGTTGACAAGAGTTGTGGACAAAAAGCCAAAATAAATATCTTCTGATTAAAAAAATTTTTTTGAAAAAAC
AAGGCCAGCCCCAACCTTCCAAACCTCCATCACCAACAACCCAAACTGGATGTCAAGCAAAATGCACAATTCCTA
CAGAAGAGGCAAGACACAGTCACCAATGATATCTCGCCAAAGAAACCACGCCACACCAATGCCAACACAAAAC
GTGTTTACTGAAAGCCGAAAACAGTATTAAAAAAGTGTGTAAGTAAAGTGTTATGGTAGGGTTCCTCAGATGTA
ATATTTTACTGGTACTATTTATTTATAAATAGGAATTCTAATTAAGTAATAACATGAAATGAAACCCAGCATAGG
AGCTGGCCAAGAGCTTTTAATTTTATTGATACTCAAAACCAAGTTTGTGTTTTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTC
CTCTTTCGAAATGTGCTTTGCTTTTTTTGATTAAAAAGAATTTTTTTTTCTTTTTTATAAACAGACCCTAATAA
AGAGAACAGGGTAAGATGTGAGGCTGAGTGTGTTAAGTACGTGAGAGAGTGTGAGTGTGTTGTAAGTGTGAGTGT
CCCTATGCGATTATGTCTCTTTACGTTGCTAAGGGGGGAGGGTGAGGATTAAGTACTCGTGCCCTATATTTGTGT
GCCAATTAATGCCTAATAAATACCATGTGCTTAAACAAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AA

SEQ ID No. 6 - Homo sapiens T-box 5 (TBX5), variante de transcripción 4, ARNm Número de acceso - NM_181486.1

TTCAGAGAGAGAGAGAGAGGGAGAGAGAGTGAGAGAGACTGACTCTTACCTCGAATCCGGGAACTTTAATCCTGA
 AAGCTGCGCTCAGAAAGGACTTCGACCATTCACTGGGCTTCCAACCTTCCCTCCCTGGGGGTGTAAAGGAGGAGC
 GGGGCACTGAGATTATATGGTTGCCGGTGCTCTTGGAGGCTATTTTGTGTTCTTTGGCGCTTGCCAACCTGGGAAG
 TATTTAGGGAGAGCAAGCGCACAGCAGAGGAGGTGTGTGTTGGAGGTGGGCAGTCGCCCGGAGGCTCCAGCGGT
 AGGTGCGCCCTAGTAGGCAGCAGTAGCCGCTATTCTGGGTAAGCAGTAAACCCCGCATAAAACCCGGAGCCACCA
 TGCTGCTCCCCCGCTCACCGCCGGCTTCCCTGCTAGGAGCAGCAGAGGATGTGGTGAATGCACCGGCTTCACC
 GAACGAGAGCAGAACCTTGC CGCGGGCACAGGGCCCTGGGCGCACCATGGCCGACGCAGACGAGGGCTTTGGCCTG
 GCGCACACGCCTCTGGAGCCTGACGCAAAAGACCTGCCCTGCGATTGAAACCCGAGAGCGCGCTCGGGGCCCCC
 AGCAAGTCCCCGTCGTCCCCGCAGGCCGCCCTTCAACCAGCAGGGCATGGAGGGAATCAAAGTGTTCCTCATGAA
 AGAGAACTGTGGCTAAAATTCCACGAAGTGGGCACGGAAATGATCATAACCAAGGCTGGAAGGCGGATGTTTCCC
 AGTTACAAAGTGAAGGTGACGGGCCTTAATCCAAAACGAAGTACATTCCTTCTCATGGACATTGTACCTGCCGAC
 GATCACAGATACAAATTCGCAGATAATAAATGGTCTGTGACGGGCAAAGCTGAGCCCGCCATGCCTGGCCGCTG
 TACGTGCACCCAGACTCCCCGCCACCGGGGCGCATTGGATGAGGCAGCTCGTCTCCTTCCAGAAACTCAAGCTC
 ACCAACCAACCACCTGGACCCATTTGGGCATATTATTCTAAATTCATGCACAAATACCAGCCTAGATTACACATC
 GTGAAAGCGGATGAAAATAATGGATTTGGCTCAAAAATAACAGCGTTCCTGCACTCACGCTTTCTGAGACTGCG
 TTTATAGCAGTGACTTCCTACCAGAACCACAAGATCAGCAATTAAGATTGAGAATAATCCCTTTGCCAAAGGA
 TTTGCGGGCAGTGATGACATGGAGCTGCACAGAATGTCAAGAATGCAAAGTAAAGAAATATCCCGTGGTCCCAGG
 AGCACCGTGAGGCAAAAAGTGGCCTCCAACCACAGTCCCTTCAGCAGCGAGTCTCGAGCTCTCTCCACCTCATCC
 AATTTGGGGTCCCAATACCAGTGTGAGAATGGTGTTCGGGCCCTCCCAGGACCTCCIGCCTCCACCCAACCCA
 TACCCACTGCCCCAGGAGCATAGCCAAATTTACCATTGTACCAAGAGGAAAGAGGAAGAATGTTCCACCACAGAC
 CATCCCTATAAAGAGCCCTACATGGAGACATCACCCAGTGAAGAAGATTCTTCTACCCTCTAGCTATCCACAG
 CAGCAGGGCCTGGGTGCCTCCTACAGGACAGAGTCGGCACAGCGGCAAGCTTGCAATGTATGCCAGCTCTGCGCCC
 CCCAGCGAGCCTGTGCCCAGCCTAGAGGACATCAGCTGCAACACGTGGCCAAGCATGCCTTCTACAGCAGCTGC
 ACCGTCACCACCGTGCAGCCCATGGACAGGCTACCCTACCAGCACTTCTCCGCTCACTTCACTCGGGGCCCTG
 GTCCCTCGGCTGGCTGGCATGGCCAACCATGGCTCCCCACAGCTGGGAGAGGGAATGTCCAGCACCAGACCTCC
 GTGGCCCACCAGCCTGTGGTCAGGCAGTGTGGGCCTCAGACTGGCCTGCAGTCCCCTGGCACCCCTTCAGCCCCCT
 GAGTTCTTACTCTCATGGCGTGCCAAGGACTCTATCCCTCATCAGTACCCTCTGTGCACGGAGTTGGCATG
 GTGCCAGAGTGGAGCGACAATAGCTAAAGTGAAGCCTGCTTCAACAACAGACATTTCTAGAGAAAGAGAGAGAGA
 GAGGAGAAAGAGAGAGAAGGAGAGAGACAGTAGCCAAGAGAACCCACGGACAAGATTTTCATTTACCCAATG
 TTCACATCTGCACTCAAGGTCGCTGGATGCTGATCTAATCAGTAGCTTGAAACCACAATTTAAAAATGTGACTT
 TCTTGTGTTTGTCTCAAAACTTAAAAAAACAAACACAAAAAGATGAGTCCACCCCCCACTACCACCACACCCATC
 AACCCAGCCACATTCACGCTACTCCCCAGATCTCTTCCCCCATTCCTTCTTTGGGCTCAGAAAAGTCTTGCCCTCA
 TTGAGTGTGTTTTCCCTAGTGCCTAGTTGGAGTCTGTCCTGTCTTGGTGTTAATGTIGACATTGTTATATAATAA
 ATGATAATATATTTTTTTCTTTCAATTTCTTAATGGGACCCAGTCCCTTATTTGGGGGAGGTCTGAGGCAAGT
 ATATTTCAAAATATGTACTTGCGGGATTCCCTTCAAGTAAACCATCCCTGAAACCTAAATTCACGTTTCCCCTTG
 ACTAAGAAAAGCACCTACCTCTGCCATGTGATGTTCTGAAAAGCCTCTGTATGTCCCATTTGCTTTGGTTTTG
 TCCTGCCTTCTCCAATATCACGTGCTCAGTTTTGCCTCTACTTACCCATGGAGTCAGGATAAACAAGTACGCTCCC

ES 2 685 319 T3

TGGCATCCTATCTTATTTCAGCCCTACCATCTTGCCAGCTCTGTCTTTCCAGCTGCTGTGCGCTAAAACGTGGCCT
ATAGCTTCCCTTCCGGAAAGCTTGCTTTGAAAAACTTAAAAAGCCCCGTTTACATGTAGGCAGGACTGTGATAA
CAGTGCAAGCTCTGTGTTGACAAGAGTTGTGGACAAAAAGCCAAAATAAATATTCTTCCTGATTAAAAAATTTT
TTTTGAAAAAACAAGGCCAGCCCCAACCTTCCAAACCTCCATCACCAACAACCCAAAACCTGGATGTCAAGCAAAA
TGCACAATTCCTACAGAAGAGGCAAGACACAGTCACCAATGATATCTCGCCAAAGAAACCACGCCACACCAATG
CCAACACAAAACCTGTGTTTACTGAAAGCCGAAAACAGTATTAAAAAAAGTGTGTAAGTAAAGTGTTATGGTAGGG
TTCTTCAGATGTAATATTTTACTGGTACTATTTATTTATAAATAGGAATTCCTAATTAAGTAATAACATGAAATGA
AAGCCAGCATAGGAGCTGGCCAAGAGCTTTTAAATTTTATTGATACTCAAACCAAGTTTGTGTTTTTTTTGTTTTT
TTTTGTTTTTTTCCCTCTTTGAAATGTGCTTTGCTTTTTTTGATTAAAAAGAATTTTTTTTTTCTTTTTTATAAA
CAGACCCTAATAAAGAGAAACAGGGTAAGATGTGAGGCTGAGTGTGTTAAGTACGTGAGAGAGTGTGAGTGTGTT
TGTAAGTGAGTGTCCCTATGCGATTATGTCTCTTTACGTTGCTAAGGGGGGAGGGTGAGGATTAAGTACTCGTGC
CTTATATTTGTGTGCCAATTAATGCCTAATAAATACCATGTGCTTAAACAAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AA

SEQ ID No. 7 - Homo sapiens T-box 18 (TBX18), ARNm Número de acceso - NM_001080508.1

ATGGCCGAGAAGCGAAGGGGCTCGCCGTGCAGCATGCTAAGCCTCAAGGCGCACGCTTTCTCGGTGGAGGCGCTG
 ATCGGCGCCGAGAAGCAGCAACAGCTTCAGAAGAAGCGGGCGAAAACCTGGGCGCCGAAGAGGCGGGGGGGCCGTG
 GACGACGGAGGCTGCAGCCGCGGGCGGGCGGGCGGAAAAGGGTTCTTCTGAGGGAGACGAAGGCGCTGCGCTC
 CCGCCCGGGCTGGGGCGACGTCTGGGCCGGCTCGGAGTGGCGCAGACCTGGAGCGGGAGCCGCGGGCGGGCTGT
 GAGGACGGCTTCCAGCAGGGAGCTTCCCCTCTGGCGTCAACGGGAGGCTCCCCAAGGGGTCTCCGGCGCGCTCC
 CTGGCCCGGGCCGGGACCCCTCTGCCCTCGCCGCAGGCCCGCGGGTGGATCTGCAGGGAGCCGAGCTCTGGAAG
 CGCTTTCATGAGATAGGCACTGAGATGATCATCACCAGGCCGGCAGGCGCATGTTTCCAGCAATGAGAGTGAAG
 ATCTCTGGATTAGATCCTCACCAGCAATATTACATTGCCATGGATATTGTACCAGTGGACAACAAAAGATACAGG
 TATGTTTACCACAGTTCGAAATGGATGGTGGCAGGTAATGCTGACTCGCCTGTGCCACCCCGTGTGTACATTCAT
 CCAGACTCGCCTGCCTCGGGGAGACTTGGATGAGACAAGTTATCAGCTTCGACAAGCTGAAGCTCACCAACAAT
 GAACTGGATGACCAAGGCCATATTATTCTTCAATCTATGCACAAAATACCAACCGCGAGTGCACGTCATCCGTA
 GACTGTGGAGACGATCTTCTCCCATCAAGCCTGTTCCATCCGGGGAGGGAGTAAAGGCATCTCCTTTCAGAA
 ACTGTCTTACACAACCGTCACTGCCTATCAGAATCAGCAGATTACTCGCCTGAAGATAGATAGGAATCCATTTGCT
 AAAGGCTTCCGAGACTCCGGGCGCAACAGAATGGGTTTGAAGCCTTGGTGGAAATCATATGCATTTGCGGACCA
 TCACTACGGACTCTGACCTTTGAAGATATCCCTGGAATTCCCAAGCAAGGCAATGCAAGTTTCTCCACCTTGCTC
 CAAGTACTGGGAATGGCGTTTCTGCCACTCACCTCACCTTTTGTCTGGCTCCTCTTGCTCCTCTCCTGCCTTC
 CATCTGGGGCCCAACACCAGCCAGCTGTGTAGTCTGGCCCTGCTGACTATTCTGCCTGTGCCCGCTCAGGCCTC
 ACCCTCAACCGATACAGCACATCTTGGCAGAGACCTACAACAGGCTCACCAACCAGGCTGGTGGAGACCTTTGCC
 CCGCCAGGACTCCCTCCTATGTGGGCGTGAGCAGCAGCACCTCCGTGAACATGTCCATGGGTGGCACTGATGGG
 GACACCTTCAGTGTCCACAGACCAGCTTATCCATGCAGATTTCCGGAAATGTCCCCCAGCTCCAGTATATCATG
 CCATCACCTCCAGCAATGCCTTCGCCACTAACCCAGCCATCAGGGTTCTATAATACTTTTAGATTACACAGC
 CCCTGTGCACTATATGGATATAACTTCTCCACATCCCCAAAACCTGGCTGCCAGTCCGTGAGAAAATTGTTTCTTCC
 CAAGGAAGTTTCTTGGGGTCTCACCGAGTGGGACCATGACGGATCGGCAGATGTTGCCCCCTGTGGAAGGAGTG
 CACCTGCTTAGCAGTGGGGGTGAGCAGAGTTTCTTTGACTCTAGGACCCTAGGAAGCTTAACTCTGTGCATCATCT
 CAAGTATCTGCACATATGGTCTGATGAAGCCTTTAAGTTAAATGACATTTGGATCTGTCTAACATATTTTCTTTT
 TCTTTTTTAAAAGCTATGTGGAAAGAACTCTCTGTGGTTTATAAAATGTACATATAATAGAAAATGAAGGCTCA
 CTGGGTTTTTTGACTTTATCATGGTGAAGTTGTAATTATCTATGGTATATATGTATGCTGTATATACATAGCACA
 TGGAGTATCACGGCCCCATTGTTCCCTGTTTCAICAGTTGCACGGAGTATTGGCAIGCGTGTAGTATGTTTA
 AGCAAAGTCTCAGACTCTTTTAAAAACAAGATGGTAAACTTAAACCTTGGCAATTATACTATCCAGAAGAACAC
 TTATAACTTAATTTATCAGAAAAATGCTCTAAACGGTTTCATACTTGATGTATTGATAACCAGCAGTAACCAGCA
 TGTAGAGICTTGTGATTTCTGTTATTTCTGGACACAGTGTGAGAATCTAAAATACAAAAGCCAGTTGAAGTCTTA
 GTGTTAGTCTGAGGTATTTGTAATCATGAAGGATCAGCTTTTTTCATTCCTGCTTATTATTTACCACACATACTA
 TATGACCTTGGGCTATAAAAAAATCATAACCCATAATAATTGTTATTTTCTTAAGGAAGTAAAGGAGAGGCTT
 GTGATTTTTTTTTTACACTTTCCATTGGGCACATAAGAGGTTCTTATTCTGTAGAGAACAAAATTTCCAGTA
 TTTTCGATTTTTTGCTTATTTTATATATCAAATAGACCATTAAAGAATGTTCTATAAACATTTTTAAATTCCAAT
 TTTACCAGGGGAGGAATATGTGATATGAGTGGAAATGGCAAAAGGAAAAATAATCCACCTCAAATTCATTGATTC
 CAATGAGAAATGTCATCTTTTAAATCAAGAGTAATACTATTGTTAACTATACCTTATGTTTTTGTATAGTTTGT

ES 2 685 319 T3

TTTTAAATTTAGAAATATTTTTCCATCTTGCTCTGAGCTTCCTGACCGATAGTATATAAGTAAAAAAATGCATT
TATGCTACTTATTTATATCTTGTAATTCCTACACATTGAACCCCTTTCCCTTCTTAACCTTGTCCGTCTGCCTG
AGTCTTTCCCAAAACAGATAGTTCCCTAGGCCTGTAIGGTGTTAAATAACACGGTGAGGAATTCAGTAGGTTATC
TCCAGCAATCTGTCTTTTGGGAGCTATAGTGCAAAGGCCAAAGCCATTACTATAAAGACCCCTCTTGGAGGACTA
AGAAGGAAGATACTAATTATGATAAAGGAACATAAAACTTTTAACCTCAACAGAATTTGTAATGTCAGAACTGG
AGAAATTAATCAGTATTAATTTTTAATTCCTAAAAATAATATATGCATGGTTGAAGAGTTAAAAACAAGTAA
CTTTGAGAGCACAGTATGAGATAAATAAAAAAGGCTAAGAATACATGATGAGGCACATTCCTTCTGAGGAGAA
AGCGAAATAACATGTCTGTGCATTGACCCATTATTACATTTTCATGTATCTTAAGCAAAAGAGCATGATTTTCTC
TCATTGCTAAAAAGAGTTGCTTTAACTCATCCCTGGATTTGGTGGGGAAAGGGTACAACCTCTGATTTGCTGTTT
CACTTTGAAACAACACAATTTGTTAGATACTTAGGGAGATATACTGTTGAATTTGCACAGGATGTGACTCTGTTT
ATACATATTAACAAATTTCCCTTTTGGATTCCCTTAGCAGTTCATCAAATTAGTATTAATTTTTAAATTTAAACT
AGCATGAAGGGACATGAAATATTTGCAGTAGGTGGATCTATGTAAGATGTTTGGGTATGGCATTAAATAGCTTGAC
AAAGATTTGGGGAAAGGTGTTAAGAATGAGTCCATCTCAGCCAATAGTGCTTGGTGTATAATTCAAGAACAGAGA
GTTTTCCATCTTGAAAAACATGGAAAGTAATGCTCTATACCCATATGTATTAATAAGAGCATTTTCTTCTTGC
CGTTGATCATTTCAGATGATACCACAATATGAGTATAATTTTTTATTAATCTTTTTTCTGGTAAAAATTTAGCAA
TATTGTACAAATGCTTTTTTAGGTTTTACTGTAAATATTAATCACCACGTCACCTCAGAGACTAGCCTTTTATT
GCTGAATTAATGACATGCATACATTGATAATTATATATCTGTATTTTATTAAAAAGTACTTAAAAATTATATTAA
AATATGTTATTAAACCCCTT

SEQ ID No. 8 - Homo sapiens short stature homeobox 2 (SHOX2), variante de transcripción 1, ARNm Número de acceso - NM_003030.4

CCTCCTCCCTCTCCTCCCCACCTCCTGTCCCATTTGATGTGTTATTATTGGGGGGCTGGAGCAGTAAAAAAGA
 AGAAGGAAAAAAGAGCGGGGCTCTGCTGGCAGAGGTTGAGCGCCGGGCTGACGTGCGGCGGCGATGGAAGA
 TACGGCGTTTCGTCTCCAAGTCTTTTGACCAGAAAGTGAAGGAGAAGAAGGAGGCGATCACGTACCGGGAGGTGCT
 GGAGAGCGGGCCGCTGCGCGGGGCCAAGGAGCCGACCGGCTGCACCGAGGCGGGCCGCGACGACCGCAGCAGCCC
 GGCAGTCCGGGCGGCGGCGGAGGCGGCGGCGGAGGAGGCGGAGGCGGCGGCGGAGGAGGCGGAGGAGGTGTAGG
 AGGAGGAGGAGCAGGCGGAGGAGCTGGAGGAGGCGCTCTCCCGTCCGGGAGCTGGACATGGGCGCCGCGGAGAG
 AAGCAGGGAGCCGGGCGAGCCCGCGACTGACGGAGGTTAGAAGGAAGCCAACGAAAGCTGAGGTCCAGGCTACGCT
 GCTTCTCCCGGGCGAGGCGTTTTCGTTTTCTGTGTCCCGGAGCTGAAAGATCGCAAAGAGGATGCGAAAGGGAT
 GGAGGACGAAGGCCAGACCAAATCAAGCAGAGGCGAAGTCGGACCAATTTACCCTGGAACAACCTCAATGAGCT
 GGAGAGGCTTTTTGACGAGACCCACTATCCCGACGCTTCATGCGAGAGGAACTGAGCCAGCGACTGGGCTGT
 GGAGGCCCGAGTGCAGTTTTGGTTTTCAAAATCGAAGAGCTAAATGTAGAAAACAAGAAAATCAACTCCATAAAGG
 TGTTCTCATAGGGGCGCCAGCCAGTTTTGAAGCTTGTAGAGTCGCACCTTATGTCAACGTAGGTGCTTTAAGGAT
 GCCATTTACGAGGATAGTCATTGCAACGTGACGCCCTTGTCTTTTCCAGTTTCCAGGCGCAGCTGCAGCTGGACAG
 CGCTGTGGCGCACGCGCACCACCACCTGCATCCGCACCTGGCCGCGCACGCGCCCTACATGATGTTCCAGCACC
 GCCCTTCGGACTGCCGCTCGCCACGCTGGCCGCGGATTCCGGCTTCCGCCGCCTCGGTAGTGGCGGCCGAGCAGC
 CGCCAAGACCACCAGCAAGAAGCTCCAGCATCGCCGATCTCAGACTGAAAGCCAAAAAGCACGCCGCGAGCCCTGGG
 TCTGTGACGCCAACGCCAGCACCAATGTCCGCGCTGTCCCGCGGCACTCAGCCTGCACGCCCTCCGCGCCCGCT
 GCTTCTCCGTTACCCCTTTGAGACCTCGGGAGCCGGCCCTTTCGCCCTCACTGACCATCCCTCGTCCCCTATC
 GCATCTTGGACTCGGAAAGCCAGACTCCACGCAGGACCAGGGATCTCACGAGGCACGCAGGCTCCGTGGCTCCTG
 CCCGTTTTCTACTCGAGGGCTTAGAATTGGTTTTGTAGGAGCGGGTTTGGGGGAGTCTGGAGAGAGACTGGAC
 AGGGGAGTGTGGAACCGCGGAGTTTTGGCTCACCGCAAAGCTGCAACGATGGACTCTTGCATAGAAAAAATC
 TTGTTAACAAATGAAAAAATGAGCAAACAAAAAATCGAAAGACAAACGGGAGAGAAAAAGGAAGGGAACCTTAT
 TTCTTAACTGCTATTTGGCAGAAGCTGAAATTGGAGAAACCAAGGAGCAAAAACAAATTTTAAATTAAGTATTT
 TATACATTTAAAAATATGAAAAACAACCCAGACGATTCTCGAGAGACTGGGGGAGTTACCAACTTAAATGTGT
 GTTTTTAAAAATGCGCTAAGAAGGCAAAGCAGAAAGAAGAGGTATACTTATTTAAAAAATAAGATGAAAAAAGT
 GCGCAGCTGGGAAGTTCACAGGTTTTGAAACTGACCTTTTTCTGCGAAGTTCACGTAAACACGAGAAATTTGATG
 AGAGAGGCGGGCCTCCTTTTACGTTGAATCAGATGCTTTGAGTTTTAAACCCACCATGTATGGAAGAGCAAGAAAA
 GAGAAAAATATAAAAACGAGGAGAGAGAAAAATAATATTAACACAAAAAATGCCACAGACAATGATTTCTCTGAG
 AAATTATATGGCAAACCTGTCTGGACTGCTGACAGTAAATTCGGTTTTGCATGTTACTTGTATTCCATTGATGG
 TGTGTCTCCTCCACCCCTTATCTCCCATGCACTCACTCCATTTTATCTTCACTATGAAAAACAATACAAAA
 GTATCTGAAATGATATATATATATCCATATATATATCATATATTTGCCATATATATATATATATATATATA
 TATATATATATATATATATTTGCCCTGTCTTTGATCCTGGGGAACAAAAGAAAAAAGTCCAGAAAGGGAAAAAAT
 ACACCTATTGTCCTAAGAAGACAGAGGTGGGCGAATATGTGGGAAAGGAAAAAGAAAAACAAGACCACCAAATG
 AAATAATGAAGGTACAGCGCCTCGCTGTGCCAGACACAGTAGGCGCTCAATCAGTATTAGTTCACCATTCCCC
 TTTTCTGTGTTCTTCTTGTGGTTTTCTGAAGTCTATTTGAAGACAGTGGTTATTTCCCCCTCTCTATCC

GTCAAATTCACCTTAAATAACACCCAGCTAGATACAGGCACTAGGTTTGTGTAAGATATGTTGATACACACGAAC
 AAAGTTTTATTTGACTATAATGTGTGGACTGACTTTCAACATTTGCATTTTATCTCACAAAGGTGTATCTATTCA
 AGTAACTTTTTTTTTTGTGTTGTTGTTCTTTTTTGTTTTTTTTTTTCTTTTGGTGTGTTGTTCAATTGATG
 AGCTATTTAAACTGGGATACCTTGGACTAAGCCAGTCTGTATCCCAATTCGCTAGCAAGCCTAAGTTTGTGGGT
 TTTGTTTTTGTTTTTGTTTTACCTTCTAATTTACAAGAAAGAGGAAAAAGCTCTTCTAACTGAACTTTGGTATGCG
 GTTGTGCTTTGTAACATTTGTTCTCCATGAAAACAAAATATTTATATTTGACATATTTTTTCTAGTGTATTA
 AGTTATTTTAAACAAAAGATGTTATCTCATGACGTGTTGTGACGACAAAATGTGTCCCTCCAAATCTGTTAAAC
 CTTTTAAATAAGTGCCAAGTTATTAATTGAAGACACTTTGCGATCAATTGAATGAAAATATCGTTTTCAATTTGAAA
 AAAAAAA

ES 2 685 319 T3

SEQ ID No. 9 - Homo sapiens short stature homeobox 2 (SHOX2), variante de transcripción 2, ARNm Número de acceso - NM_006884.3

CCTCCTCCCTCTCCTCCCCACCTCCTGTCCATTGATGTGTTATTATTGGGGGGGCTGGAGCAGTAAAAAAGA
AGAAGGAAAAAAGAGCGGGGCTCTGCTGGCAGAGGTTGAGCGCCGGGCTGACGTGCGGCGGCGATGGAAGAACT
TACGGCGTTCGTCTCCAAGTCTTTTGACCAGAAAAGTGAAGGAGAAGAAGGAGGCGATCACGTACCGGGAGGTGCT
GGAGAGCGGGCCGCTGCGCGGGGCCAAGGAGCCGACCGGCTGCACCGAGGCGGGCCGCGACGACCGCAGCAGCCC
GGCAGTCCGGGGCGGGCGGAGGGCGGGCGGAGGAGGGCGGAGGGCGGGCGGGAGGAGGGCGGAGGAGGTGTAGG
AGGAGGAGGAGCAGGCGGAGGAGCTGGAGGAGGGCGCTCTCCCGTCCGGGAGCTGGACATGGGCGCCGCGAGAG
AAGCAGGGAGCCGGGCAGCCCGCGACTGACGGAGGTGTCCCGGAGCTGAAAGATCGCAAAGAGGATGCGAAAGG
GATGGAGGACGAAGGCCAGACCAAAATCAAGCAGAGGCGAAGTCGGACCAATTTACCCTGGAACAACCTCAATGA
GCTGGAGAGGCTTTTTGACGAGACCCACTATCCCGACGCCTTCATGCGAGAGGAACTGAGCCAGCGACTGGGCCT
GTCCGGAGGCCGAGTGCAGGTTTGGTTTCAAAAATCGAAGAGCTAAATGTAGAAAAACAAGAAAATCAACTCCATAA
AGGTGTTCTCATAGGGGCCAGCCAGTTTGAAGCTTGTAGAGTCGCACCTTATGTCAACGTAGGTGCTTTAAG
GATGCCATTTGAGCAGGATAGTCATTGCAACGTGACGCCCTTGTCTTTTTCAGGTTTTCAGGCGCAGCTGCAGCTGGA
CAGCGTGTGGCGCACGCGCACCACCACCTGCATCCGCACCTGGCCGCGCACGCGCCCTACATGATGTTCCGAGC
ACCGCCCTTCGGACTGCCGCTCGCCACGCTGGCCGCGGATTCGGCTTCCGCCGCTCGGTAGTGGCGGCCGCGAGC
AGCCGCCAAGACCACCAGCAAGAACTCCAGCATCGCCGATCTCAGACTGAAAGCCAAAAAGCACGCCGAGCCCT
GGGTCTGTGACGCCAACGCCAGCACCAATGTGCGGCCTGTCCCGCGGCACCTCAGCCTGCACGCCCTCCGCGCCCC
GCTGCTTCTCCGTTACCCCTTTGAGACCTCGGGAGCCGGCCCTCTTCCCGCCTCACTGACCATCCCTCGTCCCCT
ATCGCATCTTGGACTCGGAAAGCCAGACTCCACGCAGGACCAGGGATCTCACGAGGCACGCAGGCTCCGTGGCTC
CTGCCCGTTTTCTACTCGAGGGCCTAGAAATGGGTTTTGTAGGAGCGGGTTTGGGGGAGTCTGGAGAGAGACTG
GACAGGGGAGTGTGGAACCGCGGAGTTTGGCTCACCGCAAAGCTGCAACGATGGACTCTTGCATAGAAAAAAA
ATCTTGTAAACAATGAAAAATGAGCAAAACAAAAAATCGAAAGACAAACGGGAGAGAAAAAGAGGAAGGGA
TATTTCTAACTGCTATTTGGCAGAAGCTGAAATTTGAGAACCAAGGAGCAAAAACAATTTTAAAATTAAGTA
TTTTATACATTTAAAAATATGAAAAACAACCCAGACGATTCTCGAGAGACTGGGGGAGTTACCAACTTAAATG
TGTGTTTTTAAAAATGCGCTAAGAAGGCAAGCAGAAAGAAGAGGTATACTTATTTAAAAAATAAGATGAAAA
AGTGGCGCAGCTGGGAAGTTCACAGTTTTGAAACTGACCTTTTTCTGCGAAGTTCACGTTAACACGAGAAATTTG
ATGAGAGAGGCGGGCCCTCTTTTACGTTGAATCAGATGCTTTGAGTTTAAACCCACCATGTATGGAAGAGCAAGA
AAAGAGAAAAATTTAAACGAGGAGAGAGAAAAATAATATTAACACAAAAAATGCCACAGACAATGATTTCTCT
GAGAAATATATATGGCAAACTGTCTGGACTGCTGACAGTAAATTCGGTTTGCATGTTACTTGTATTCCATTGA
TGGTGTGCTCTCTCCACCCCTTATCTCCCATGCACTCACTCCATTTTCACTTCACTATGAAAAACAATACCA
AAAGTATCTGGAAATGATATATATATATCCATATATATATATCATATATTTGCCATATATATATATATATAT
ATATATATATATATATATATATTTGCCCTGTCTTTGATCCTGGGGAACAAAAAGAAAAAGTCAAGAAAGGAAAA
ATTACACTCATTGTCTAAGAAGACAGAGGTGGGCAGAATATGTGGGAAAGGAAAAAGAAAAACAAGACCACCA
ATGAAATAATGAAGGTACAGCGCTCGCTGTGCCAGACACAGTAGGCGCTCAATCAGTATTAGTTCCACCAATC
CCCTTTTCTGTGTTCTTCTTGTGGTTTTCTGAAGTCTTATTTGAAGACAGTGGTTTATTTCCCTCTCTAT
CCCGTCAAATTCACCTTAAATAACACCAGCTAGATACAGGCCTAGGTTTGTGTAAGATATGTTGATACACAG
AACAAAGTTTATTTTACTATAATGTGTGGACTGACTTTCAACATTTGCATTTTATCTCACAAAGGTGTATCTAT

TCAAGTAACTTTTTTTTTTGTGTTGTTGTTCTTTTTTGTGTTTTTTTTTCTTTTGGTTGTTTGTTCATTCA
TGTAGCTATTTAAACTGGGATACCTTGGACTAAGCCAGTCTGTATCCCAATTCGCTAGCAAGCCTAAGTTTGTGG
GGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTTACCTTCTAATTTACAAGAAAGAGGAAAAAGCTCTCTAACTGAACTTTGGIAT
GCGGTTGAGCTTTGTAACATTTGTCTCCATGAAAACAAATTTATTTATTTGACATATTTTTTCTAGTGTA
TTAAGTTATTTTAAACAAAAGATGTTATCTCATGACGTGTTGTCAGTACAAAATGTGTGCGCTCCAATTCGTTA
AACCTTTTAAATAAGTGCCAAGTTATTAATTTGAAGACACTTTGCGATCAATTTGAATGAAAAATATCGTTTCATTG
AAAAA

ES 2 685 319 T3

SEQ ID No. 10 - Homo sapiens short stature homeobox 2 (SHOX2), variante de transcripción 3, ARNm Número de acceso - NM_001163678.1

CCTCCTCCCTCTCCTCCCCACCTCCTGTCCATTGATGTGTTATTATTGGGGGGCTGGAGCAGTAAAAAAGA
AGAAGGAAAAAAGAGCGGGGCTCTGCTGGCAGAGGTTGAGCGCCGGGCTGACGTGCGGCGGCATGGAAGAACT
TACGGCGTTCGTCTCCAAGTCTTTTGACCAGAAAAGTGAAGGAGAAGAAGGAGGCGATCACGTACCGGGAGGTGCT
GGAGAGCGGGCCGCTGCGCGGGGCCAAGGAGCCGACCGGCTGCACCGAGGCGGGCCGCGACGACCGCAGCAGCCC
GGCAGTCCGGGCGGGCCGGGAGGCGGCGGAGGAGGCGGAGGCGGCGGAGGAGGCGGAGGAGGTGTAGG
AGGAGGAGGAGCAGGCGGAGGAGCTGGAGGAGGGCGCTCTCCCGTCCGGGAGCTGGACATGGGCGCCGCGAGAG
AAGCAGGGAGCCGGGCGAGCCCGCGACTGACGGAGGTGTCCCGGAGCTGAAAGATCGCAAAGAGGATGCGAAAGG
GATGGAGGACGAAGGCCAGACCAAAATCAAGCAGAGGCGAAGTCGGACCAATTTACCCTGGAACAACCTCAATGA
GCTGGAGAGGCTTTTTGACGAGACCCACTATCCCGACGCCTTCATGCGAGAGGAACTGAGCCAGCGACTGGGCCT
GTCCGAGGCCCGAGTGCAGGTTTGGTTTTCAAAATCGAAGAGCTAAATGTAGAAAAACAAGAAAATCAACTCCATAA
AGGTGTTCTCATAGGGCCGCCAGCCAGTTTGAAGCTTGTAGAGTCGCACCTTATGTCAACGTAGGTGCTTTAAG
GATGCCATTTGAGCAGGTTTCAAGCGCAGCTGCAGCTGGACAGCGCTGTGGCGCACGCGCACACCACCCTGCATCC
GCACCTGGCCGCGCACGCGCCCTACATGATGTTCCCGACACCGCCCTTCGGACTGCCGCTCGCCACGCTGGCCGC
GGATTCGGCTTCCGCGCCTCGGTAGTGGCGGCCGAGCAGCCGCCAAGACCACCAGCAAGAAGCTCCAGCATCGC
CGATCTCAGACTGAAAGCCAAAAAGCACGCCGAGCCCTGGGTCTGTGACGCCAACGCCAGCACAATGTGCGGC
CTGTCCCGCGGCACTCAGCCTGCACGCCCTCCGCGCCCCGCTGCTTCTCCGTTACCCCTTTGAGACCTCGGGAGC
CGGCCCTCTTCCCGCCTCACTGACCATCCCTCGTCCCCTATCGCATCTTGGACTCGGAAAGCCAGACTCCACGCA
GGACCAGGATCTCACGAGGCACGCAGGCTCCGTGGCTCCTGCCGTTTTCCCTACTCGAGGGCTAGAATGGGT
TTTGTAGGAGCGGGTTTGGGGGAGTCTGGAGAGAGACTGGACAGGGGAGTGTGGAAACCGCGGAGTTTGGCTCAC
CGCAAAGCTGCAACGATGGACTCTTGATAGAAAAAAAATCTTGTAAACAATGAAAAATGAGCAAAACAAAAA
ATCGAAAGACAAACGGGAGAGAAAAAGAGGAAGGGAACCTATTTCTTAACTGCTATTTGGCAGAAGCTGAAATTG
GAGAACCAAGGAGCAAAAACAAATTTAAAAATTAAGTATTTTATACATTTAAAAATATGAAAAACAACCCAGA
CGATTCTCGAGAGACTGGGGGAGTTACCAACTTAAATGTGTGTTTTTAAAAATGCGCTAAGAAGGCAAAGCAGA
AAGAAGAGGTATACTTATTTAAAAACTAAGATGAAAAAAGTGCAGCAGCTGGGAAGTTTACAGGTTTTGAACTG
ACCTTTTTCTGCGAAGTTCACGTTAACACGAGAAATTTGATGAGAGAGGCGGGCCTCCTTTTACGTTGAATCAGA
TGCTTTGAGTTTTAAACCCACCATGTATGGAAGAGCAAGAAAAAGAGAAAATATTA AACGAGGAGAGAGAAAAATA
ATATTAACACAAAAAATGCCACAGACAATGATTTCTCTGAGAAATTTATATGGCAAACTGTCTGGACTGCTGA
CAGTAAATTCGGTTTTGCATGTTACTTGTATCCATTGATGGTGTGTCTCCTCCACCCCTTATCTCCCATGCA
CTCACTCCATTTTCTCTTCACTATGAAAAACAATACCAAAGTATCTGGAAATGATATATATATATCCATATA
TATATATCATATATTTGCCATTTGCCCTGTCTTG
ATCCTGGGGAACAAAAGAAAAAAGTCAGAAAGGAAAAAATTACACTCATTGTCTTAAGAAGACAGAGGTGGGCA
GAATATGTGGGAAAGGAAAAAGAAAAACAAGACCACCAAAATGAAATAATGAAGGTACAGCGCCTCGCTGTGCCAG
ACACAGTAGGCGCTCAATCAGTATTAGTTCACCATTTCCCTTTTTCTTGTGTCTCTTCTTGTGGTTTTCTGAA
GTCTTATTTGAAGACAGTGGTTTTATTTCCCCCTCTCTATCCCGTCAAATTCACCTTAAATAACCCAGCTAGAT
ACAGGCACTAGGTTTGTGTAAGATATGTTGATACACACGAACAAAGTTTTATTTGACTATAATGTGTGGACTGAC
TTTCAACATTTGCATTTTATCTCACAAAGGTGATCTATTCAAGTAACCTTTTTTTTTTTGTTTGTGTTTCTTT

TTTGTTTTTTTTTTTTTCTTTTGGTTGTTTGTTC AATTGATGAGCTATTTAAACTGGGATACCTTGGACTAAGCC
AGTCTGTATCCCAATTCGCTAGCAAGCCTAAGTTTGTGGGTTTTGTTTTTGTGTTTTTACCTTCTAATTTA
CAAGAAAGAGGAAAAGCTCTTCTAACTGAACTTTGGTATGCGGTTGAGCTTTGTAACCTATTTGTTCTCCATGAAA
ACAAAATATTTATATTTGACATATTTTTTCTAGTGTATTAAGTTATTTTAAACAAAAGATGTTATCTCATGAC
GTGTTGTGAGTACAAAATGTGTGCGCTCCAAATCTGTTAAACCTTTTTAAATAAGTGCCAAGTTATTAATTGAAGA
CACTTTGCATCAATTTGAATGAAAATATCGTTTCATTTGAAAAA

Lista de secuencia

<110> Cedars Sinai Medical Center

Marban, Eduardo

Cho, Hee Cheol

- 5 <120> Generación de marcapasos biológicos usando factores de transcripción
<130> CSMC.001WO
<150> 61/557,812
<151> 2011-11-09
<160> 10
- 10 <170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 4754
<212> ADN
<213> Homo sapiens
- 15 <220>
<221> características_misc
<223> Homo sapiens T-box 3 (TBX3), variante de transcripción 1
<220>
<221> características_misc
- 20 <223> NM_005996.3
<400> 1

ES 2 685 319 T3

gaattctaga ggcggcggag ggtggcgagg agctctcgct ttctctcgct cctccctct	60
ccgactcogt ctctctctct ctctctctct ctcccctccc tctctttccc tctgttccat	120
tttttcccc tctaaatcct ccctgccttg cgcgcctgga cacagattta ggaagcgaat	180
tcgctcaogt tttaggacaa ggaagagaga gaggcacggg agaagagccc agcaagattt	240
ggattgaaac cgagacaccc tccggaggct cggagcagag gaaggaggag gaggcggcg	300
aacggaagcc agtttgcaat tcaagttttg atagcgttg tagaaggggg tttaaatcag	360
atTTTTTTTT ttttaaagga gagagacttt ttccgctctc tcgctccctg ttaaagccgg	420
gtctagcaca gctgcagacg ccaccagcga gaaagagga gaggaagaca gatagggggc	480
gggggaagaa gaaaaagaaa ggtaaaaagt cttctaggag aacctttcac atttgcaaca	540
aaagacctag gggctggaga gagattcctg ggacgcaggg ctggagtgtc tatttcgagc	600
tcagcggcag ggctcggggc cgagtcgaga cctgctcgc tcctctcgct tctgaaaccg	660
acgttcagga gcggcttttt aaaaacgcaa ggcacaagga cggtcacccg cgcgactatg	720
tttgctgatt tttgccttg ccctctttaa aagcggcctc ccattctcca aaagacactt	780
ccctcctcc ctttgaagtg cattagttgt gatttctgcc tccttttctt ttttctttct	840
tttttgtttt gctttttccc cccttttgaa ttatgtgctg ctgttaaaca acaacaaaaa	900
aacaacaaaa cacagcagct gcggacttgt ccccggtgg agcccagcgc cccgcctgga	960

ES 2 685 319 T3

gtggatgagc ctctccatga gagatccggt cattcctggg acaagcatgg cctaccatcc 1020
 gttcctacct caccggggcg cggacttcgc catgagcgcg gtgctgggtc accagccgcc 1080
 gttcttcccc gcgctgacgc tgcctcccaa cggcgcgggc gcgctctcgc tgccggggcg 1140
 cctggccaag ccgatcatgg atcaattggt gggggcgggc gagaccggca tcccgttctc 1200
 ctccctgggg ccccaggcgc atctgaggcc tttgaagacc atggagcccg aagaagaggt 1260
 ggaggacgac cccaaggtgc acctggaggc taaagaactt tgggatcagt ttcacaagcg 1320
 gggcaccgag atggtcatta ccaagtccgg aaggcgaatg tttcctccat ttaaagtgag 1380
 atgttctggg ctggataaaa aagccaaata cattttattg atggacatta tagctgctga 1440
 tgactgtcgt tataaatttc acaattctcg gtggatggtg gctggtaagg ccgacccccg 1500
 aatgccaaag aggatgtaca ttcacccgga cagccccgct actggggaac agtggatgtc 1560
 caaagtctgc actttccaca aactgaaact caccaacaac atttcagaca aacatggatt 1620
 tactatattg aactccatgc acaataacca gccccggttc cacattgtaa gagccaatga 1680
 catcttgaaa ctcccttata gtacatttcg gacatacttg ttccccgaaa ctgaattcat 1740
 cgctgtgact gcataccaga atgataagat aaccagtta aaaatagaca acaacccttt 1800
 tgcaaaaggt ttccgggaca ctggaaatgg ccgaagagaa aaaagaaaac agctcacccct 1860
 gcagtccatg aggggtgtttg atgaaagaca caaaaaggag aatgggacct ctgatgagtc 1920
 ctccagtgaa caagcagctt tcaactgctt cggccaggct tcttctccag ccgcctccac 1980
 tgtagggaca tcgaacctca aagatttatg tcccagcgag ggtgagagcg acgccgaggc 2040
 cgagagcaaa gaggagcatg gccccgaggc ctgcgacgcg gccaagatct ccaccaccac 2100
 gtoggaggag ccctgccgtg acaagggcag ccccgcggtc aaggctcacc ttttcgctgc 2160
 tgagcggccc cgggacagcg ggcggctgga caaagcgtcg cccgactcac gccatagccc 2220
 cgccaccatc tcgtccagca ctgcggcct gggcgcgagg gagcgcagga gcccggttcg 2280
 cgagggcaca gcgccggcca aggtggaaga ggcgcgcgcg ctcccgggca aggaggcctt 2340
 cgcgccgctc acggtgcaga cggacgcggc cgcgcgcac ctggcccagg gccccctgcc 2400
 tggcctcggc ttcgccccgg gcctggcggg ccaacagttc ttcaacgggc acccgtctt 2460
 cctgcacccc agccagtttg ccatgggggg cgccttctcc agcatggcgg ccgctggcat 2520
 gggccccctc ctggccacgg tttctggggc ctccaccggt gtctcgggcc tggattccac 2580
 ggccatggcc tctgccgctg cggcgcaggg actgtccggg gcgtccgcg ccaccctgcc 2640
 cttccacctc cagcagcag tcttggcctc tcagggcctg gccatgtccc ctttcggaag 2700
 cctgttccct taccctaca cgtacatggc cgcagcggcg gccgctcct ctgcggcagc 2760
 ctccagctcg gtgcaccgcc accccttct caatctgaac accatgcgcc cgcggtcgcg 2820

ES 2 685 319 T3

ctacagcccc tactccatcc cggtgccggt cccggacggc agcagtctgc tcaccaccgc	2880
cctgccctcc atggcggcgg cgcgggggcc cctggacggc aaagtcgccg ccctggccgc	2940
cagcccggcc tcggtggcag tggactcggg ctctgaactc aacagccgct cctccacgct	3000
ctcctccagc tccatgtcct tgtcgcccaa actctgcgcg gagaaagagg cggccaccag	3060
cgaactgcag agcatccagc ggttggttag cggcttgaa gccaaagccg acaggtcccg	3120
cagcgcgtcc ccgtagacc gtcccagaca cgtcttttca ttccagtcca gttcaggctg	3180
ccgtgcactt tgtcggatat aaaataaacc acgggcccgc catggcgta gcccttcctt	3240
ttgcagttgc gtctgggaag gggccccgga ctccctcgag agaatgtgct agagacagcc	3300
cctgtcttct tggcgtggtt tatatgtcgg gatctggat cagattctgg gggctcagaa	3360
acgtcggttg cattgagcta ctggggtag gagttccaac atttatgtcc agagcaactt	3420
ccagcaaggc tggctcgggt ctctgccac caggcgggga ggtgttcaa gacatctccc	3480
tcagtgcgga tttatatata tatttttct tcaactgtgc aagtggaaac aaaaacaaaa	3540
tctttcaaaa aaaaaatcgg gacaagtga cacattaaca tgattctgtt tgtgcagatt	3600
aaaaacttta tagggacttg cattatcgg tctcaataaa ttactgagca gctttgttg	3660
gggaggggaag tcctaccat cctgttttag tctatattaa gaaaatctgt gtctttttaa	3720
tattctgtg atgttttcag agccgctgta ggtctcttct tgcagtcca cagtaatga	3780
tttgtggtt ttattttgaa cgcttgctt tagagagaaa acaatatagc ccctaccct	3840
tttcccaatc ctttgcctc aatcagtg cccaaggag ggggggattt aaaggggaag	3900
agtgggcaaa acacataaaa tgaatttatt atatctaagc tctgtagcag gattcatgtc	3960
gttctttgac agttcttct ctttctgta tatgcaataa caaggttta aaaaaataat	4020
aaagaagtga gactattaga caaagtatt atgtaattat ttgataactc ttgtaaatag	4080
gtggaatatg aatgcttga aaattaaact ttaatttatt gacattgtac atagctctgt	4140
gtaaatagaa ttgcaactgt caggtttgt gttcttgtt tcctttagt gggtttattt	4200
ccaggtcaca gaattgctgt taactactaga aaacacactt cctgcaccaa caccaatacc	4260
ctttcaaaag agttgtctgc aacatttttg ttttctttt taatgtcaa aagtggggga	4320
aagtgtatt tcctatttc accaaaattg ggaaggagt gccacttcc agctccactt	4380
caaattcctt aaaatataac tgagattgct gtggggagg aggaggcag aggctgcggt	4440
ttgacttttt aatttttct ttgttattg tatttgctag tctctgattt cctcaaaacg	4500
aagtggaatt tactactgt gtcagtatog gtgttttgaa ttggtgctg cctatagaga	4560
tatattcaca gttcaaaagt caggtgctga gagatggtt aaagacaaat tcatgaaggt	4620
atattttgtg ttatagttgt tgatgagttc tttggtttc tgtatttttc ccctctctt	4680
taaaacatca ctgaaattc aataaattt tattgaaatg tctaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4740
aaaaaaaaaa aaaa	4754

ES 2 685 319 T3

<210> 2
 <211> 4814
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5 <220>
 <221> características_misc
 <223> Homo sapiens T-box 3 (TBX3), variante de transcripción 2
 <220>
 <221> características_misc
 10 <223> Número de acceso - NM_016569.3
 <400> 2

```

gaattctaga ggcggcggag ggtggcgagg agctctcgct ttctctcgct cactcactct      60
ccgactcogt ctctctctct ctctctctct ctccccctcc tctctttccc tctgttccat      120
tttttcccc tctaaatcct ccctgccttg cgcgcctgga cacagattta ggaagcgaat      180
tcgctcacgt ttaggacaa ggaagagaga gaggcacggg agaagagccc agcaagattt      240
ggattgaaac cgagacaccc tccggaggct cggagcagag gaaggaggag gagggcggcg      300
aacggaagcc agtttgcaat tcaagttttg atagcgcctgg tagaaggggg tttaaatcag      360
atTTTTTTTT ttttaaagga gagagacttt ttccgctctc tcgctccttg ttaaagccgg      420
gtctagcaca gctgcagacg ccaccagcga gaaagagggg gaggaagaca gatagggggc      480
gggggaagaa gaaaaagaaa ggtaaaaagt cttctaggag aacctttcac atttgcaaca      540
aaagacctag gggctggaga gagattcctg ggacgcaggg ctggagtgtc tatttogagc      600
tcagcggcag ggctcgggcg cgagtcgaga cctgctcgc tctctcgct tctgaaaccg      660
acgttcagga gcggcttttt aaaaacgcaa ggcacaagga cggtcacccg cgcgactatg      720
tttgctgatt tttgccttg cctctttta aagcggcctc ccattctcca aaagacactt      780
ccctcctcc ctttgaagtg cattagttgt gatttctgcc tccttttctt ttttctttct      840
tttttgttt gctttttccc cccttttgaa ttatgtgctg ctgttaaaca acaacaaaaa      900
aacaacaaaa cacagcagct gcggacttgt ccccgctgg agcccagcgc cccgcctgga      960
gtggatgagc ctctccatga gagatccggt cattcctggg acaagcatgg cctaccatcc     1020
gttcoctacot caccgggccc cggacttcgc catgagcgcg gtgctgggtc accagccgcc     1080
gttcttcccc gcgctgacgc tgcctccaa cggcgcggcg gcgctctcgc tgccgggccc     1140
cctggccaag ccgatcatgg atcaattggt gggggcggcc gagaccggca tcccgttctc     1200
ctcctggggg ccccaggcgc atctgaggcc tttgaagacc atggagcccg aagaagaggt     1260
ggaggacgac cccaaggtgc acctggaggc taaagaactt tgggatcagt ttcacaagcg     1320
    
```

ES 2 685 319 T3

gggcaccgag atggtcatta ccaagtcggg aaggcgaatg tttcctccat ttaaagtgag 1380
 atgttctggg ctggataaaa aagccaaata cattttattg atggacatta tagctgctga 1440
 tgactgtcgt tataaatttc acaattctcg gtggatgggt gctggtaagg cggaccccga 1500
 aatgccaaag aggatgtaca ttcacccgga cagccccgct actggggaac agtggatgtc 1560
 caaagtcgtc actttocaca aactgaaact caccaacaac atttcagaca aacatggatt 1620
 tactttggcc ttcccaagtg atcacgctac gtggcagggg aattatagtt ttggtactca 1680
 gactatattg aactccatgc acaaatacca gccccggttc cacattgtaa gagccaatga 1740
 catcttgaaa ctcccttata gtacatttcg gacatacttg ttccccgaaa ctgaattcat 1800
 cgctgtgact gcataccaga atgataagat aaccagtta aaaatagaca acaacccttt 1860
 tgcaaaaggt ttccgggaca ctggaaatgg ccgaagagaa aaaagaaaac agctcaccct 1920
 gcagtcctag aggggtgttg atgaaagaca caaaaaggag aatgggacct ctgatgagtc 1980
 ctccagtga caagcagctt tcaactgctt cgcccaggct tcttctccag ccgcctccac 2040
 tgtagggaca tcgaacctca aagatttatg tcccagcgag ggtgagagcg acgccgaggc 2100
 cgagagcaaa gaggagcatg gccccgaggc ctgcgacgcg gccaaagatct ccaccaccac 2160
 gtccggaggag cctgcccgtg acaagggcag ccccgcggtc aaggctcacc ttttcgctgc 2220
 tgagcggccc cgggacagcg ggcggctgga caaagcgtcg cccgactcac gccatagccc 2280
 cgccaccatc tcgtccagca ctcgcgccct gggcgcgag gagcgcagga gcccggttcg 2340
 cgagggcaca gcgcccggca aggtggaaga ggcgcgcgcg ctcccgggca aggagccctt 2400
 cgcgcccgtc acggtgcaga cggacgcggc cgcgcgcac ctggcccagg gccccctgcc 2460
 tggcctcggc ttgccccgg gcttgccggg ccaacagttc ttcaacgggc acccgctctt 2520
 cctgcacccc agccagtttg ccatgggggg cgcttctcc agcatggcgg ccgctggcat 2580
 gggctcccctc ctggccacgg tttctggggc ctccaccggt gtctcgggccc tggattccac 2640
 ggccatggcc tctgcccgtg cggcgcaggg actgtccggg gcgtccgagg ccaccctgcc 2700
 cttccacctc cagcagcacg tcttgccctc tcagggcctg gccatgtccc ctttcggaag 2760
 cctgttcctt tacccttaca cgtacatggc cgcagcggcg gccgcctcct ctgcccagc 2820
 ctccagctcg gtgcaccgcc accccttctt caatctgaac accatgcgcc cgcggctgag 2880
 ctacagcccc tactccatcc cggtgccggt cccggacggc agcagctctgc tcaccaccgc 2940
 cctgccctcc atggcggcgg ccgcggggcc cctggacggc aaagtgcgg ccctggccgc 3000
 cagcccggcc tcggtggcag tggactcggg ctctgaactc aacagccgct cctccacgct 3060
 ctctccagc tccatgtcct tgtcgcccaa actctgcgcg gagaaagagg cggccaccag 3120
 cgaactgcag agcatccagc ggttggttag cggcttgaa gccaaagcgg acaggtcccg 3180
 cagcgcgtcc ccgtagacct gtcccagaca cgtcttttca ttccagtcca gttcaggctg 3240

ES 2 685 319 T3

ccgtgcactt tgtcggatat aaaataaacc acgggcccgc catggcgta gcccttcctt 3300
 ttgcagttgc gtctgggaag gggccccgga ctccctcgag agaatgtgct agagacagcc 3360
 cctgtcttct tggcgtggtt tatatgtccg ggatctggat cagattctgg gggctcagaa 3420
 acgtcggttg cattgagcta ctgggggtag gaggttccaac atttatgtcc agagcaactt 3480
 ccagcaaggc tggctctgggt ctctgccac caggcgggga ggtgttcaaa gacatctccc 3540
 tcagtgcgga tttatatata ttttttcct tcaactgtgc aagtggaaac aaaaacaaaa 3600
 tctttcaaaa aaaaaatcgg gacaagtga cacattaaca tgattctggt tgtgcagatt 3660
 aaaaacttta tagggacttg cattatcggc tctcaataaa ttactgagca gctttgtttg 3720
 gggagggaag tccctaccat ccttgtttag tctatattaa gaaaatctgt gtctttttaa 3780
 tattcttggt atgttttcag agccgctgta ggtctcttct tgcattgtcca cagtaatgta 3840
 tttgtggttt ttattttgaa cgcttgcttt tagagagaaa acaatatagc cccctaccct 3900
 tttcccaatc ctttgccctc aatcagtgta cccaaggag ggggggattt aaaggaagg 3960
 agtgggcaaa acacataaaa tgaatttatt atatctaagc tctgtagcag gattcatgtc 4020
 gttctttgac agttctttct ctttcctgta tatgcaataa caaggtttta aaaaaataat 4080
 aaagaagtga gactattaga caaagtattt atgtaattat ttgataactc ttgtaaatag 4140
 gtggaatatg aatgcttggg aattaaact ttaatttatt gacattgtac atagctctgt 4200
 gtaaatagaa ttgcaactgt caggttttgt gttcttggtt tcttttagtt gggtttattt 4260
 ccaggtcaca gaattgctgt taacactaga aaacacactt cctgcaccaa caccaatacc 4320
 ctttcaaaag agttgtctgc aacatttttg tttcttttt taatgtccaa aagtggggga 4380
 aagtgctatt tctattttc accaaaattg ggggaaggagt gccactttcc agctccactt 4440
 caaattcctt aaaatataac tgagattgct gtggggaggg aggagggcag aggctgcggt 4500
 ttgacttttt aatttttctt ttgttatttg tatttgctag tctctgattt cctcaaaacg 4560
 aagtggaatt tactactggt gtcagtatcg gtgttttgaa ttgggtgctg cctatagaga 4620
 tatattcaca gttcaaaagt cagggtctga gagatggttt aaagacaaat tcatgaaggt 4680
 atattttgtg ttatagttgt tgatgagttc tttggttttc tgtatttttc cccctctctt 4740
 taaaacatca ctgaaatttc aataaatttt tattgaaatg tctaaaaaaa aaaaaaaaaa 4800
 aaaaaaaaaa aaaa 4814

<210> 3

<211> 3921

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> características_misc

<223> Homo sapiens T-box 5 (TBX5), variante de transcripción 1

<220>

<221> características_misc

5 <223> Número de acceso - NM_000192.3

<400> 3

ES 2 685 319 T3

catgccttat gcaagagacc tcagtcccc ggaacaactc gatttccttc caatagaggt	60
ctgaggtgga ctcccacctc ccttcgtgaa gagttccctc ctctcccctt tcctaagaaa	120
gtogatcttg gctctatttg tgtcttatgt tcatcacctt cattcctccg gagaaagccg	180
ggttggttta tgtctttatt tattcccggg gccaaagcgt ccggaacctg tggctgcgca	240
gaccggcac tgataggcga agacggagag aaatttacct cccgccgtg cccccagcc	300
aaacgtgaca gcgcgcgggc cggttgcgtg actcgtgacg tctccaagtc ctataggtgc	360
agcggctggt gagatagtcg ctatgcctg gttgcctctt tattttactg gggatgcct	420
ggtaataaac agtaatattt aatttgcgg agaccacaaa ccaaccttga gctgggaggt	480
acgtgctctt cttgacagac gttggaagaa gacctggcct aaagaggtct cttttggtgg	540
tccttttcaa agtcttcacc tgagccctgc tctccagcga ggcgcactcc tggcttttgc	600
gctccaaaga agaggtggga tagttggaga gcagaacctt gcgcgggcac agggccctgg	660
gcgcaccatg gccgacgcag acgagggctt tggcctggcg cacacgcctc tggagcctga	720
cgcaaaagac ctgccctgcg attcgaaacc cgagagcgcg ctcggggcc cagcaagtc	780
cccgtcgtcc ccgcaggccg ccttcacca gcagggcatg gagggaatca aagtgtttct	840
ccatgaaaga gaactgtggc taaaattcca cgaagtgggc acggaaatga tcataaccaa	900
ggctggaagg cggatgtttc ccagttacaa agtgaaggtg acgggcctta atccaaaac	960
gaagtacatt cttctcatgg acattgtacc tgccgacgat cacagataca aattcgcaga	1020
taataaatgg tctgtgacgg gcaaagctga gcccgccatg cctggccgcc tgtacgtgca	1080
cccagactcc cccgccaccg gggcgcattg gatgagggcag ctcgtctcct tccagaaact	1140
caagctcacc aacaaccacc tggaccocatt tgggcatatt attctaaatt ccatgcacaa	1200
ataccagcct agattacaca tcgtgaaagc ggatgaaaat aatggatttg gctcaaaaaa	1260
tacagcgttc tgcactcacg tctttcctga gactgcgttt atagcagtga cttcctacca	1320
gaaccacaag atcacgcaat taaagattga gaataatccc ttgccaag gatttcgggg	1380
cagtgatgac atggagctgc acagaatgtc aagaatgcaa agtaaagaat atcccgtggt	1440
ccccaggagc accgtgaggc aaaaagtggc ctccaaccac agtcctttca gcagcgagtc	1500
tcgagctctc tccacctcat ccaatttggg gtoccaatac cagtgtgaga atggtgtttc	1560
cggcccctcc caggacctcc tgccctccacc caaccatac cactgcccc aggagcatag	1620
ccaaatttac cattgtacca agaggaaaga ggaagaatgt tccaccacag accatcccta	1680

ES 2 685 319 T3

taagaagccc tacatggaga catcacccag tgaagaagat tccttctacc gctctagcta	1740
tccacagcag cagggcctgg gtgcctccta caggacagag tgggcacagc ggcaagcttg	1800
catgtatgcc agctctgcgc cccccagcga gcctgtgccc agcctagagg acatcagctg	1860
caacacgtgg ccaagcatgc cttcctacag cagctgcacc gtcaccaccg tgcagcccat	1920
ggacaggcta ccctaccagc acttctccgc tcacttcacc tgggggcccc tggtcocctcg	1980
gctggctggc atggccaacc atggctcccc acagctggga gagggaatgt tccagcacca	2040
gacctccgtg gccaccagc ctgtggtcag gcagtggtgg cctcagactg gcctgcagtc	2100
ccctggcacc cttcagcccc ctgagttcct ctactctcat ggcgtgcaa ggactctatc	2160
ccctcatcag taccactctg tgcacggagt tggcatggtg ccagagtgga gcgacaatag	2220
ctaaagtgag gctgtcttca caacagacat ttcttagaga aagagagaga gagaggagaa	2280
agagagagaa ggagagagac agtagccaag agaacccccac ggacaagatt tttcatttca	2340
cccaatgttc acatctgcac tcaaggtcgc tggatgtgta tctaatacagt agcttgaaac	2400
cacaatttta aaaatgtgac tttcttgttt tgtctcaaaa cttaaaaaaa caaacacaaa	2460
aagatgagtc ccacccccca ctaccaccac acccatcaac cagccacatt cacgctactc	2520
cccagatctc ttccccatt ccttcttttg ggctctagaa agtcttgctt cattgagtgt	2580
ttttccctag tgcgtagtgt gagtctgtcc ctgtcttggg gttaatggtg acattgttat	2640
ataataaatg ataatatatt tttttctttc aattttctta atgggacca gtcccttatt	2700
tggggggagg tctgaggcaa gtatatttca aaatatgtac ttgogggatt cccttcaagt	2760
aaaccatccc tgaaacctaa attcaogttt cccttgact aagaaaagca cctacctctg	2820
ccatgtgatg tttctgaaaa gcctctgtat gtccccattt gctttggttt tgtcctgctt	2880
tctccaatat cacgtgctca gttttgcttc tacttaccoc tggagtcagg ataacactga	2940
cgctccctgg catcctatct tattcagccc taccatcttg ccagctctgt ctttccagct	3000
gtctgtgctt aaaacgtggc ctatagcttc ccttcoggaa agcttgcttt gaaaaactta	3060
aaaagcccc gtttacatgt aggcaggact gtgataacag tgcaagctct gtgttgacaa	3120
gagttgtgga caaaaagcca aaataaatat tcttctgat taaaaaatt tttttgaaa	3180
aaaacaaggc cagccccaac cttccaaacc tccatcacca acaacccaaa ctggatgtca	3240
agcaaaatgc acaattccta cagaagaggc aagacacagt caccaatgat atctcgccaa	3300
agaaaccacg cccacaccaa tgccaacaca aaactgtgtt tactgaaagc cgaaaacagt	3360
attaaaaaaa gtgtgtaagt aaagtgttat ggtagggttc ttcagatgta atattttact	3420
ggtactatth atttataaat aggaattcta attaagtaat aacatgaaat gaaaccacgc	3480
ataggagctg gccaaagact ttttaattta ttgatactca aaaccaagtt tgtgtttttt	3540

ES 2 685 319 T3

```
tgtttttttt tgtttttttc ctcttttcgaa tgtgctttgc tttttttgat taaaaagaat 3600
tttttttttc cttttttata aacagaccct aataaagaga acagggtaag atgtgaggct 3660
gagtgtgttt aagtacgtga gagagtgtga gtgtgtttgt aagtgagtgt ccctatgcga 3720
ttatgtctct ttacgttgct aaggggggag ggtgaggatt aagtactcgt gccttatatt 3780
tgtgtgccaa ttaatgccta ataaatacca tgtgcttaaa caagtaaaaa aaaaaaaaaa 3840
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3900
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a
```

<210> 4

<211> 1050

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> características_misc

<223> Homo sapiens T-box 5 (TBX5), variante de transcripción 2

10 <220>

<221> características_misc

<223> Número de acceso - NM_080718.1

<400> 4

ES 2 685 319 T3

```

atggccgacg cagacgaggg ctttggcctg ggcacacgc ctctggagcc tgacgcaaaa      60
gacctgccct gcgattcgaa acccgagagc gcgctcgggg ccccagcaa gtccccgtcg      120
tccccgcagg ccgccttcac ccagcagggc atggagggaa tcaaagtgtt tctccatgaa      180
agagaactgt ggctaaaatt ccacgaagtg ggcacggaaa tgatcataac caaggctgga      240
aggcggatgt ttcccagtta caaagtgaag gtgacggggc ttaatcccaa aacgaagtac      300
attcttctca tggacattgt acctgccgac gatcacagat acaaattcgc agataataaa      360
tggctctgtg cgggcaaagc tgagcccgcc atgcctggcc gcctgtacgt gcacccagac      420
tcccccgcca ccggggcgca ttggatgagg cagctcgtct ccttcagaa actcaagctc      480
accaacaacc acctggacct atttgggcat attattctaa attccatgca caaataccag      540
cctagattac acatcgtgaa agcggatgaa aataatggat ttggctcaaa aaatacagcg      600
ttctgactc acgtctttcc tgagactgcg tttatagcag tgacttcta ccagaaccac      660
aagatcacgc aattaaagat tgagaataat ccctttgcca aaggatttcg gggcagtgat      720
gacatggagc tgacagaat gtcaagaatg caaagtaaag aatatcccgt ggtccccagg      780
agcaccgtga ggcaaaaagt ggcctccaac cacagtcctt tcagcagcga gtctcgagct      840
ctctccacct catccaattt ggggtoccaa taccagtgtg agaatgggtt ttccggcccc      900
tcccaggacc tctgcctcc acccaacca taccactgc cccaggagca tagccaaatt      960
taccattgta ccaagaggaa aggtgagtgt gatcccct ggtcaatttg ctttctttct     1020

taccttttcc tttccttggg ttgggggtga                                     1050

```

<210> 5

<211> 3736

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> características_misc

<223> Homo sapiens T-box 5 (TBX5), variante de transcripción 3

<220>

10 <221> características_misc

<223> Número de acceso - NM_080717.2

<400> 5

ES 2 685 319 T3

catgccttat gcaagagacc tcagtccccc ggaacaactc gatttccttc caatagaggt	60
ctgaggtgga ctcccacctc ccttcgtgaa gagttccctc ctctccccct tcctaagaaa	120
gtcgatcttg gctctatctg tgtcttatgt tcatcaccct cattcctccg gagaaagccg	180
ggttggttta tgtctttatt tattcccggg gccaaagacgt ccggaacctg tggctgcgca	240
gaccocggcac tgataggcga agacggagag aaatttacct cccgccgctg cccccagcc	300
aaacgtgaca gcgcgcgggc cggttgcgtg actcgtgacg tctccaagtc ctataggtgc	360
agcggctggt gagatagtcg ctatcgcctg gttgcctctt tattttactg gggtatgcct	420
ggtaataaac agtaatatct aatttgcgtg agaccacaaa ccaaccttga gctgggaggt	480
acgtgctctt cttgacagac gttggaagaa gacctggcct aaagaggtct cttttggtgg	540
tccttttcaa agtcttcacc tgagccctgc tctccagcga ggcgcaactcc tggcttttgc	600
gctccaaaga agaggtggga tagttggagg gcatggaggg aatcaaagtg tttctccatg	660
aaagagaact gtggctaaaa ttccacgaag tgggcacgga aatgatcata accaaggctg	720
gaaggcggat gtttcccagt tacaagtga aggtgacggg ccttaatccc aaaacgaagt	780
acattcttct catggacatt gtacctgccg acgatcacag atacaaattc gcagataata	840
aatggtctgt gacgggcaaa gctgagcccg ccatgcctgg ccgcctgtac gtgcacccag	900
actccccgc caccggggcg cattggatga ggcagctcgt ctcttccag aaactcaagc	960
tcaccaacaa ccacctggac ccatttgggc atattattct aaattccatg cacaaatacc	1020
agcctagatt acacatcgtg aaagcggatg aaaataatgg atttggctca aaaaatacag	1080
ogttctgcac tcacgtcttt cctgagactg cgtttatagc agtgacttcc taccagaacc	1140
acaagatcac gcaattaaag attgagaata atccctttgc caaaggattt cggggcagtg	1200
atgacatgga gctgcacaga atgtcaagaa tgcaaagtaa agaatatccc gtggtcccca	1260
ggagcacctg gaggcaaaaa gtggcctcca accacagtcc tttcagcagc gagtctcgag	1320

ES 2 685 319 T3

ctctctccac ctcatccaat ttgggggtccc aataccagtg tgagaatggt gtttccggcc 1380
cctcccagga cctcctgcct ccaccaacc cataccact gcccaggag catagccaaa 1440
tttaccattg taccaagagg aaagaggaag aatgttccac cacagacat ccctataaga 1500
agccctacat ggagacatca cccagtgaag aagattcctt ctaccgctct agctatccac 1560
agcagcaggg cctgggtgcc tctacagga cagagtcggc acagcggcaa gcttgcatgt 1620
atgccagctc tgcgcccccc agcgagcctg tgcccagcct agaggacatc agctgcaaca 1680
cgtggccaag catgccttcc tacagcagct gcaccgtcac caccgtgcag cccatggaca 1740
ggctacccta ccagcacttc tccgctcact tcacctcggg gccctcggtc cctcggctgg 1800
ctggcatggc caaccatggc tccccacagc tgggagaggg aatgttccag caccagacct 1860
ccgtggcca ccagcctgtg gtcaggcagt gtgggcctca gactggcctg cagtcccctg 1920
gcacccttca gcccctgag ttccttact ctcatggcgt gccaggact ctatcccctc 1980
atcagtacca ctctgtgcac ggagttggca tggtgccaga gtggagcgac aatagctaaa 2040
gtgaggcctg cttcacaaca gacatttctt agagaaagag agagagagag gaaaaagaga 2100
gagaaggaga gagacagtag ccaagagaac cccacggaca agatttttca tttcacccaa 2160
tgttcacatc tgcaactcaag gtcgctggat gctgatctaa tcagtagctt gaaaccacaa 2220
ttttaaaaat gtgactttct tgttttgtct caaaacttaa aaaaacaaac aaaaaagat 2280
gagtcccacc cccactacc accacacca tcaaccagcc acattcacgc tactccccag 2340
atctottccc ccattccttc ttttgggctc tagaaagtct tgccctattg agtgtttttc 2400
cctagtgcgt agttggagtc tgcctcctgc ttgggtgtaa tgttgacatt gttatataat 2460
aaatgataat atattttttt ctttcaattt tcttaatggg acccagtcct ttatttgggg 2520
ggaggtctga ggcaagtata tttcaaaaata tgtacttgcg ggattccctt caagtaaacc 2580
atccctgaaa cctaaattca cgtttccctt tgactaagaa aagcacctac ctctgccatg 2640
tgatgtttct gaaaagcctc tgtatgtccc catttgcttt ggttttgtcc tgccctctcc 2700
aatatcacgt gctcagtttt gcctctactt acccatggag tcaggataac actgacgctc 2760
cctggcatcc tatcttattc agccctacca tcttgccagc tctgtcttcc cagctgtctg 2820
tcgctaaaac gtggcctata gcttcccttc cggaaagctt gctttgaaaa acttaaaaag 2880
ccccgttta catgtaggca ggactgtgat aacagtgcaa gctctgtgtt gacaagagtt 2940
gtggacaaaa agccaaaata aatattcttc ctgattaaaa aaattttttt tgaaaaaaac 3000
aaggccagcc ccaaccttcc aaacctccat caccaacaac ccaaactgga tgtcaagcaa 3060
aatgcacaat tctacagaa gaggcaagac acagtcacca atgatatctc gccaaagaaa 3120
ccacgcccac accaatgcca acacaaaact gtgtttactg aaagccgaaa acagtattaa 3180
aaaaagtgtg taagtaaagt gttatggtag ggttcttcag atgtaatatt ttactggtac 3240

ES 2 685 319 T3

```

tatttattta taaataggaa ttctaattaa gtaataacat gaaatgaaac ccagcatagg      3300
agctggccaa gagcttttaa ttttattgat actcaaaacc aagtttgtgt ttttttgttt      3360
ttttttgttt ttttcctctt tcgaatgtgc tttgcttttt ttgattaaaa agaatttttt      3420
ttttcctttt ttataaacag accctaataa agagaacagg gtaagatgtg aggctgagtg      3480
tgtttaagta cgtgagagag tgtgagtgtg tttgtaagtg agtgtcccta tgcgattatg      3540
tctctttacg ttgctaaggg gggaggggtga ggattaagta ctcgtgcctt atatttgtgt      3600
gccaatat gctaataaa taccatgtgc ttaaacaagt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      3660
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      3720
aaaaaaaaaa aaaaaa                                     3736

```

<210> 6

<211> 3749

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> características_misc

<223> Homo sapiens T-box 5 (TBX5), variante de transcripción 4

<220>

10 <221> características_misc

<223> Número de acceso - NM_181486.1

<400> 6

ES 2 685 319 T3

ttcagagaga gagagagagg gagagagagt gagagagact gactccttacc togaatccgg	60
gaactttaat cctgaaagct gcgctcagaa aggacttcga ccattcactg ggcttccaac	120
tttccctccc tgggggtgta aaggaggagc ggggcactga gattatatgg ttgccgggtgc	180
tcttgagggc tattttgtgt tctttggcgc ttgccaaactg ggaagtattt agggagagca	240
agcgcacagc agaggagggtg tgtgttgag gtgggcagtc gccgcggagg ctccagcgggt	300
aggtgccc tagtaggcag cagtagccgc tattctgggt aagcagtaaa ccccgcataa	360
acccgggagc caccatgcct gctccccgc ctcaccgcg gcttccctgc taggagcagc	420
agaggatgtg gtgaatgcac cggcttcacc gaacgagagc agaaccttgc gggggcacag	480
ggcctgggc gcaccatggc cgacgcagac gagggctttg gctggcgca caccgctctg	540
gagcctgacg caaaagacct gccctgcgat tcgaaaccg agagcgcgct cggggcccc	600
agcaagtccc cgtcgtcccc gcaggccgcc ttcaccagc agggcatgga gggaatcaaa	660
gtgtttctcc atgaaagaga actgtggcta aaattccagc aagtgggcac ggaaatgatc	720
ataaccaagg ctggaaggcg gatgtttccc agttacaaag tgaagggtgac gggccttaat	780
cccaaacga agtacattct tctcatggac attgtacctg ccgacgatca cagatacaaa	840

ES 2 685 319 T3

ttcgcagata ataaatggtc tgtgacgggc aaagctgagc ccgccatgcc tggccgcctg	900
tacgtgcacc cagactcccc cgccaccggg gcgcattgga tgaggcagct cgtctccttc	960
cagaaaactca agctcaccaa caaccacctg gaccatttg ggcatattat tctaaattcc	1020
atgcacaaat accagcctag attacacatc gtgaaagcgg atgaaaataa tggatttggc	1080
tcaaaaaata cagcgttctg cactcacgtc tttcctgaga ctgcgtttat agcagtgact	1140
tcctaccaga accacaagat cagcaatta aagattgaga ataatccctt tgccaaagga	1200
tttcggggca gtgatgacat ggagctgcac agaatgtcaa gaatgcaaag taaagaatat	1260
cccgtagtcc ccaggagcac cgtgaggcaa aaagtggcct ccaaccacag tcctttcagc	1320
agcaggtctc gagctctctc cacctcatcc aatttggggc cccaatacca gtgtgagaat	1380
ggtgtttccg gccctccca ggacctcctg cctccacca acccataccc actgccccag	1440
gagcatagcc aaatttacca ttgtaccaag aggaaagagg aagaatgttc caccacagac	1500
catccctata agaagcccta catggagaca tcaccagtg aagaagattc cttctaccgc	1560
tctagctatc cacagcagca gggcctgggt gcctcctaca ggacagagtc ggcacagcgg	1620
caagcttgca tgtatgccag ctctgcgcc cccagcgagc ctgtgccag cctagaggac	1680
atcagctgca acacgtggcc aagcatgcct tcctacagca gctgcaccgt caccaccgtg	1740
cagcccatgg acaggctacc ctaccagcac ttctccgctc acttcacctc ggggccctg	1800
gtccctoggc tggctggcat ggccaaccat ggctccccac agctgggaga gggaatgttc	1860
cagcaccaga cctccgtggc ccaccagcct gtggtcaggc agtgtgggcc tcagactggc	1920
ctgcagtccc ctggcacctc tcagccccct gagttcctct actctcatgg cgtgccaaag	1980
actctatccc ctcatcagta ccactctgtg cacggagttg gcatggtgcc agagtggagc	2040
gacaatagct aaagtgaggc ctgcttcaca acagacattt cctagagaaa gagagagaga	2100
gaggagaaag agagagaagg agagagacag tagccaagag aaccccacgg acaagatfff	2160
tcatttcacc caatgttcac atctgcactc aaggtcgtg gatgctgac taatcagtag	2220
cttgaaacca caattttaa aatgtgactt tcttgtttg tctcaaaact taaaaaaca	2280
aacacaaaaa gatgagtccc accccccact accaccacac ccatcaacca gccacattca	2340
cgctactccc cagatctctt cccccattcc ttttttggg ctctagaaag tcttgctca	2400
ttgagtgtt ttccctagtg cgtagttgga gtctgtccct gtcttggtgt taatgttgac	2460
attgttatat aataaatgat aatatatfff tttctttcaa ttttcttaat gggaccagt	2520
ccottatftg gggggaggtc tgaggcaagt atatftcaaa atatgtactt gcgggattcc	2580
cttcaagtaa accatccctg aaacctaaat tcacgtttcc ccttgactaa gaaaagcacc	2640
tacctctgcc atgtgatgtt tctgaaaagc ctctgtatgt cccatttgc tttggttttg	2700
tcctgccttc tccaatatca cgtgctcagt tttgcctcta attaccatg gagtcaggat	2760

ES 2 685 319 T3

```

aacactgacg ctccctggca tccatcttta ttcagcccta ccatcttgcc agctctgtct 2820
ttccagctgt ctgtcgctaa aacgtggcct atagcttccc ttccggaaag cttgctttga 2880
aaaacttaaa aagccccogt ttacatgtag gcaggactgt gataacagtg caagctctgt 2940
gttgacaaga gttgtggaca aaaagccaaa ataaatattc ttcttgatta aaaaaatttt 3000
ttttgaaaaa aacaaggcca gccccaacct tccaaacctc catcaccaac aaccctaaact 3060
ggatgtcaag caaaatgcac aattcctaca gaagaggcaa gacacagtca ccaatgatat 3120
ctcgccaaag aaaccaagcc cacaccaatg ccaacacaaa actgtgttta ctgaaagccg 3180
aaaacagtat taaaaaaagt gtgtaagtaa agtgttatgg tagggttctt cagatgtaat 3240
atcttactgg tactatctat ttataaatag gaattctaata taagtaataa catgaaatga 3300
aaccagcat aggagctggc caagagcttt taattttatt gatactcaa accaagtttg 3360
tgtttttttg tttttttttg tttttttcct ctttcgaatg tgctttgctt tttttgatta 3420
aaaagaattt tttttttcct tttttataaa cagaccctaa taaagagaac agggtaagat 3480
gtgaggctga gtgtgtttta gtacgtgaga gagtgtgagt gtgtttgtaa gtgagtgtcc 3540
ctatgcgatt atgtctcttt acgttgctaa ggggggaggg tgaggattaa gtactcgtgc 3600
cttatatttg tgtgccaatt aatgcctaata aaataccatg tgcttaaaca agtaaaaaaaaa 3660
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3720
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3749

```

<210> 7

<211> 4070

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> características_misc

<223> Homo sapiens T-box 18 (TBX18)

<220>

10 <221> características_misc

<223> Número de acceso - NM_001080508.1

<400> 7

ES 2 685 319 T3

atggccgaga agcgaagggg ctgcgcgtgc agcatgctaa gcctcaaggc gcacgctttc	60
tcggtggagg cgctgatcgg cgccgagaag cagcaacagc ttcagaagaa gcggcgaaaa	120
ctgggcgccg aagaggcggc gggggccgtg gacgacggag gctgcagccg cggcggcggc	180
gcgggcgaaa agggttcttc tgagggagac gaaggcgctg cgctcccgcc gccggctggg	240
gcgacgtctg ggccggctcg gagtggcgca gacctggagc gcggagccgc gggcggctgt	300
gaggacggct tccagcaggg agcttcccct ctggcgctac cgggaggctc cccaagggg	360

ES 2 685 319 T3

tctccggcgc gctccctggc ccggcccggg acccctctgc cctcgcogca ggccccgcgg 420
gtggatctgc agggagccga gctctggaag cgctttcatg agataggcac tgagatgatc 480
atcaccaagg ccggcaggcg catgtttcca gcaatgagag tgaagatctc tggattagat 540
cctcaccagc aatattacat tgccatggat attgtaccag tggacaacaa aagatacagc 600
tatgtttacc acagttcgaa atggatggtg gcaggtaatg ctgactcgcc tgtgccaccc 660
cgtgtgtaca ttcatccaga ctgcctgcc tcgggggaga cttggatgag acaagttatc 720
agcttcgaca agctgaagct caccaacaat gaactggatg accaaggcca tattattctt 780
cattctatgc acaatacca accgcgagtg cacgtcatcc gtaaagactg tggagacgat 840
ctttctocca tcaagcctgt tccatccggg gagggagtaa aggcattctc ctttccagaa 900
actgtttca caaccgtcac tgcctatcag aatcagcaga ttactcgctt gaagatagat 960
aggaatccat ttgctaaagg cttccgagac tccggggcga acagaatggg tttggaagcc 1020
ttggtggaat catatgcatt ctggcgacca tcaactacga ctctgacctt tgaagatatac 1080
cctggaattc ccaagcaagg caatgcaagt tccctcacct tgcctcaagg tactgggaat 1140
ggcgttcctg ccaactaccc tcaccttttg tctggctcct cttgctcctc tcctgccttc 1200
catctggggc ccaacaccag ccagctgtgt agtctggccc ctgctgacta ttctgcctgt 1260
gcccgcctcag gcctcacctt caaccgatac agcacatctt tggcagagac ctacaacagc 1320
ctcacciaacc aggtcgtgta gacctttgcc ccgcccagga ctccctccta tgtgggcgtg 1380
agcagcagca cctccgtgaa catgtccatg ggtggcactg atggggacac cttcagctgc 1440
ccacagacca gcttatccat gcagatttcg ggaatgtccc cccagctcca gtatatcatg 1500
ccatcacctt ccagcaatgc cttcgccact aaccagaccc atcagggttc ctataatact 1560
tttagattac acagcccctg tgcactatat ggatataact tctccacatc ccccaaactg 1620
gctgccagtc ctgagaaaat tgtttcttcc caaggaagtt tcttggggtc ctcaccgagt 1680
gggaccatga cggatcggca gatgttgccc cctgtggaag gactgcacct gcttagcagt 1740
gggggtcagc agagtttctt tgactctagc accctagga gcttaactct gtcacatctc 1800
caagtatctg cacatatggt ctgatgaagc ctttaagtta aatgacattt ggatctgtct 1860
aacatatttt cttttctttt tttaaaagct atgtggaaag aaactctctg tggtttataa 1920
aatgtacata taatagaaa tgaaggctca ctgggttttt tgactttatc atggtgagat 1980
tgtaattatc tatggtatat atgtatgctg tatatacata gcacatggag taccacggcc 2040
cctattgttc ccctgtttca tccagttgca cggagtattg gcatgcgtgt agtatgttta 2100
agcaaagttc tcagactctt ttaaaaacaa gatggtaaac ttaaaaactg gcaattatac 2160
tatccagaag aacacttata acttaattta tcagaaaaat gctctaaacg gtttcatact 2220
tgatgtattg ataaccagca gtaaccagca tgtagagtct tgtgatttct gttattcttg 2280

ES 2 685 319 T3

gacacagtgt gagaatctaa aatacaaaag ccagttgaag tcttagtggt agtcctgagg 2340
tatttghtaat catgaaggat cagctttttc attcctgctt attatttacc acacatacta 2400
tatgaccttg ggtctataaa aaaatcataa cccataataa ttggtatttt ctttaaggaag 2460
gtaaaggaga ggcttgtgat tttttttttt acactttcca ttgggcacat aagaggttct 2520
tattcatctg tagagaacaa atttccagta ttttcgattt tttgcttatt ttatataatca 2580
aatagaccat taaagaatgt tctataaaca tttttaaatt ccaattttca ccaggggagg 2640
aatatgtgat atgagtggaa tggcaaaagg aaaataaatc cacctcaaat tcattgattc 2700
caatgagaaa tgtctatctt ttaaatacaag agtaatacta ttgttaacta taccttatgt 2760
ttttgtatag tttgttttta aatttagaat attttttcca tcttgctctg agcttcctga 2820
ccgatagtat ataagtaaaa aaaatgcatt tatgctactt atttatatct tgtaattcct 2880
acacattgaa cccttttccc cttcttaacc ttgtccgtct gcctgagtct ttcccaaac 2940
agatagttcc taggcctgta tgggtgttaa taacacgggtg aggaatttca gtaggttatc 3000
tccagcaatc tgtcttttgg gagctatagt gcaaaggcca aagcccatta ctataaagac 3060
cctcttgag gactaagaag gaagatacta attatgataa aggaactata aaacttttaa 3120
cctcaacaga atttghtaatg tcagaactgg agaaattaa atcagtatta aattttttaa 3180
ttcctaaaat aatatatgca tggttgaaga gttaaaaaca agtaactttg agagcacagt 3240
atgagataaa taaaaaaggc taagaataca tgatgaggca cattcccctt ctgaggagaa 3300
agcgaaataa catgtctgtg cattgacca ttcattacat ttcattgtatc ttaagcaaaa 3360
gagcatgatt ttctctcatt gctaaaaaga gttgctttta ctcacccctg gatttgggtg 3420
ggaaagggtta caactcctga tttgctgttt cactttgaaa caacacaatt tgtagatatac 3480
ttagggagat atactgttga atttgcacag gatgtgactc tgtttatatac tattaacaaa 3540
tttccttttg gattccttag cagttcatca aattagtatt aaatttttaa attttaaact 3600
agcatgaagg gacatgaaat atttgcagta ggtggatcta tgtaagatgt ttgggtatgg 3660
cattaatagc ttgacaaaaga tttggggaaa ggtgttaaga atgagtccat ctcagccaat 3720
agtgcttgggt gtataattca agaacagaga gttttccatc ttgaaaaaac atggaaagta 3780
atgctctata cccatatgta ttaataagag cattttcctt cttgccgttg atcatttcag 3840
atgataccac aatatgagta taatttttta ttaatctttt ttctggtaaa attttagcaa 3900
tattgtacaa atgctttttt taggttttac tgtaaatatt aatcaccacg tcacttcaga 3960
gactagcctt ttattgctga attaaatgac atgcatacat tgataattat atatctgtat 4020
tttattaaaa agtacttaaa attatattaa aatatgttat taaacccttt 4070

<211> 3233

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

5 <221> características_misc

<223> sapiens short stature homeobox 2 (SHOX2), variante de transcripción 1

<220>

<221> características_misc

<223> Número de acceso - NM_003030.4

10 <400> 8

ES 2 685 319 T3

cctcctccct	ctcctcccc	acctcctgtc	ccattgatgt	gttattattg	ggggggctgg	60
agcagtaaaa	aaagaagaag	gaaaaaaga	gcggggctct	gctggcagag	gttgagcgcc	120
gggctgacgt	gcggcggcga	tggaagaact	taogggcgtt	gtctccaagt	cttttgacca	180
gaaagtgaag	gagaagaagg	aggcgatcac	gtaccgggag	gtgctggaga	gcggggccgct	240
gcgcggggcc	aaggagccga	ccggctgcac	cgaggcgggc	cgcgacgacc	gcagcagccc	300
ggcagtccgg	gcggccggcg	gaggcggcgg	cggaggaggc	ggaggcggcg	gcggaggagg	360
cggaggaggt	gtaggaggag	gaggagcagg	cggaggagct	ggaggagggc	gctctcccgt	420
ccgggagctg	gacatgggcg	ccgccgagag	aagcagggag	ccgggcagcc	cgcgactgac	480
ggagggtaga	aggaagccaa	cgaaagctga	ggtccaggct	acgctgcttc	tcccgggcga	540
ggcgtttcgg	tttcttgtgt	ccccggagct	gaaagatcgc	aaagaggatg	cgaaagggat	600
ggaggacgaa	ggccagacca	aatcaagca	gaggcgaagt	cggaccaatt	tcaccctgga	660
acaactcaat	gagctggaga	ggctttttga	cgagaccac	tatcccagc	ccttcatgcg	720
agaggaactg	agccagcgac	tgggcctgtc	ggaggcccg	gtgcaggttt	ggtttcaaaa	780
tcaagagct	aatgtagaa	aacaagaaa	tcaactccat	aaagtggttc	tcataggggc	840
cgccagccag	tttgaagctt	gtagagtgc	accttatgtc	aacgtaggtg	ctttaaggat	900
gccatttcag	caggatagtc	attgcaacgt	gacgcccttg	tcctttcagg	ttcaggcgca	960
gctgcagctg	gacagcgctg	tggcgcacgc	gcaccaccac	ctgcatccgc	acctggccgc	1020
gcacgcgccc	tacatgatgt	tcccagcacc	gccttcgga	ctgccgctcg	ccacgctggc	1080
cgcggttcg	gcttccgccg	cctcggtagt	ggcggccgca	gcagccgcca	agaccaccag	1140
caagaactcc	agcatcgccg	atctcagact	gaaagccaaa	aagcacgccg	cagccctggg	1200
tctgtgacgc	caacgccagc	accaatgtcg	cgctgtccc	gcggcactca	gcctgcacgc	1260
cctccgcgcc	ccgctgcttc	tccgttacc	ctttgagacc	tgggagccg	gcctcttcc	1320
cgctcactg	accatccctc	gtcccctatc	gcactttgga	ctcggaaagc	cagactccac	1380
gcaggaccag	ggatctcacg	aggcaagcag	gtccggtggc	tcctgcccg	tttctactc	1440
gagggcctag	aattgggttt	tgtaggagcg	ggtttggggg	agtctggaga	gagactggac	1500

ES 2 685 319 T3

aggggagtgc tggaaaccgcg gagtttggct caccgcaaag ctgcaacgat ggactcttgc 1560
 atagaaaaaa aaatcttggt aacaatgaaa aaatgagcaa acaaaaaaat cgaaagacaa 1620
 acgggagaga aaaagaggaa gggaacttat ttcttaactg ctatttggca gaagctgaaa 1680
 ttggagaacc aaggagcaaa aacaaatfff aaaattaaag tattttatac atttaaaaat 1740
 atggaaaaac aaccagacg attctcgaga gactgggggg agttaccaac ttaaatgtgt 1800
 gtttttaaaa atgcgctaag aaggcaaagc agaaagaaga ggtatactta tttaaaaaac 1860
 taagatgaaa aaagtgcgca gctgggaagt tcacaggttt tgaaactgac ctttttctgc 1920
 gaagttcacg ttaacacgag aaatttgatg agagagggcg gcctcctttt acgttgaatc 1980
 agatgctttg agtttaaac caccatgtat ggaagagcaa gaaaagagaa aatattaaaa 2040
 cgaggagaga gaaaaataat attaacacaa aaaaatgcc aagacaatga tttctctgag 2100
 aaattattat ggcaaaactg tctggactgc tgacagtaaa ttccggtttg catgttactt 2160
 gtattccatt gatggtgtgt ctctcccac ccccttatct cccatgcact cactccattt 2220
 tcatcttcac tatgaaaaac aatacaaaa gtatctggaa attgatatat atatatccat 2280
 atatatatat catatatattg ccatatatat atatatatat atatatatat atatatatat 2340
 atatttgccc tgtctttgat cctggggaac aaaagaaaa agtcagaaag ggaaaaaatt 2400
 aactcattg tctaagaag acagaggtgg gcagaatatg tggggaaagg aaaaagaaaa 2460
 caagaccacc aaatgaaata atgaaggtac agcgcctcgc tgtgccagac acagtagggc 2520
 ctcaatcagt attagttccc accattcccc tttcttctgt ttcttcttg ttggtttctt 2580
 gaagtcctat ttgaagacag tggtttattt cccctctct atcccgtcaa attcacctta 2640
 aataacacc agctagatac aggcactagg tttgtgtaag atatggtgat acacacgaac 2700
 aaagtttatt ttgactataa tgtgtggact gactttcaac atttgcattt tatctcacia 2760
 aggtgtatct attcaagtaa cctttttttt ttgtttgttt gtttcttttt tgtttttttt 2820
 tttcttttg ttgtttgttt caattcatgt agctatftaa actgggatac cttggactaa 2880
 gccagtctgt atcccattc gctagcaagc ctaagtttgt ggggttttgt ttttgttttt 2940
 gttttacctt ctaatttaca agaaagagga aaagctcttc taactgaact ttggtatgcg 3000
 gttgagcttt gtaactattt gttctccatg aaaacaaaat tatttatatt tgacatattt 3060
 tttctagtgt tattaagtta ttttaacaa aagatgftat ctcatgacgt gttgtcagta 3120
 caaatgtgt cgcctccaat tctgttaaac cttttaaata agtgccaagt tattaattga 3180
 agacactttg cgatcaattg aatgaaaata tcttttctt tgaaaaaaaa aaa 3233

<210> 9

<211> 3161

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> características_misc

<223> Homo sapiens short stature homeobox 2 (SHOX2), variante de transcripción 2

5 <220>

<221> características_misc

<223> Número de acceso - NM_006884.3

<400> 9

ES 2 685 319 T3

cctcctccct	ctcctcccc	acctcctgtc	ccattgatgt	gttattattg	ggggggctgg	60
agcagtaaaa	aaagaagaag	gaaaaaaaaa	gcggggctct	gctggcagag	gttgagcgcc	120
gggctgacgt	gcggcggcga	tggaagaact	tacggcgttc	gtctccaagt	cttttgacca	180
gaaagtgaag	gagaagaagg	aggcgatcac	gtaccgggag	gtgctggaga	gcgggcccgt	240
gcgcggggcc	aaggagccga	ccggctgcac	cgaggcgggc	cgcgacgacc	gcagcagccc	300
ggcagtccgg	gcggccggcg	gaggcggcgg	cggaggaggc	ggaggcggcg	gcggaggagg	360
cggaggaggt	gtaggaggag	gaggagcagg	cggaggagct	ggaggagggc	gctctcccgt	420
ccgggagctg	gacatgggcg	ccgcgagag	aagcagggag	ccgggcagcc	cgcgactgac	480
ggaggtgtcc	ccggagctga	aagatcgcaa	agaggatgcg	aaagggatgg	aggacgaagg	540
ccagaccaaaa	atcaagcaga	ggcgaagtcg	gaccaatttc	accctggaac	aactcaatga	600
gctggagagg	ctttttgacg	agaccacta	tcccgacgcc	ttcatgagag	aggaactgag	660
ccagcgactg	ggcctgtcgg	aggcccaggt	gcaggtttgg	tttcaaaatc	gaagagctaa	720
atgtagaaaa	caagaaaatc	aactocataa	aggtgttctc	ataggggccc	ccagccagtt	780
tgaagcttgt	agagtcgcac	cttatgtcaa	cgtaggtgct	ttaaggatgc	catttcagca	840
ggatagtcat	tgcaacgtga	cgcccttgtc	ctttcaggtt	caggcgcagc	tgcagctgga	900
cagcgtgtg	gcgcacgcgc	accaccacct	gcattccgcac	ctggccgcgc	acgcgcccta	960
catgatgttc	ccagcaccgc	ccttcggact	gccgctcgcc	acgctggccg	cggattcggc	1020
ttccgcccgc	tcggtagtgg	cggccgcagc	agccgccaa	accaccagca	agaactccag	1080
catcgccgat	ctcagactga	aagccaaaaa	gcacgcccga	gccctgggtc	tgtgacgcca	1140
acgccagcac	caatgtcgcg	cctgtcccgc	ggcactcagc	ctgcacgccc	tccgcgcccc	1200
gctgcttctc	cgttaccctt	ttgagacctc	gggagccggc	cctcttcccg	cctcactgac	1260
catccctcgt	cccctatcgc	atcttggact	cggaaagcca	gactccacgc	aggaccaggg	1320
atctcagag	gcacgcaggc	tcogtggctc	ctgcccgttt	tcctactcga	gggcctagaa	1380
ttgggttttg	taggagcggg	tttgggggag	tctggagaga	gactggacag	gggagtgtg	1440
gaaccgcgga	gtttggctca	ccgcaaagct	gcaacgatgg	actcttgcac	agaaaaaaaa	1500

ES 2 685 319 T3

atcttgtaa caatgaaaa atgagcaaac aaaaaaatcg aaagacaaac gggagagaaa 1560
 aagaggaagg gaacttattt cttaactgct atttggcaga agctgaaatt ggagaaccaa 1620
 ggagcaaaaa caaatTTTaa aattaaagta ttttatacat ttaaaaatat ggaaaaacaa 1680
 cccagacgat tctcgagaga ctggggggag ttaccaactt aaatgtgtgt ttttaaaaat 1740
 gcgctaagaa ggcaaagcag aaagaagagg tatacttatt taaaaaacta agatgaaaaa 1800
 agtgcgcagc tgggaagttc acaggTTTTg aaactgacct ttttctgca agttcacggt 1860
 aacacgagaa atttgatgag agaggcgggc ctcttttac gttgaatcag atgctttgag 1920
 tttaaaccca ccatgtatgg aagagcaaga aaagagaaaa tattaaaacg aggagagaga 1980
 aaaataatat taacacaaaa aaatgccaca gacaatgatt tctctgagaa attattatgg 2040
 caaaactgtc tggactgctg acagtaaatt ccggtttgca tgttacttgt attccattga 2100
 tgggtgtgtct cctcccacc ccttatctcc catgcactca ctccattttc atcttcaacta 2160
 tgaaaaacaa taccaaaagt atctggaaat tgatatatat atatccatat atatatatca 2220
 tatatttgcc atatatatat atatatatat atatatatat atatatatat atttgcctg 2280
 tctttgatcc tggggaacaa aagaaaaaag tcagaaaggg aaaaaattac actcattgtc 2340
 ctaagaagac agaggtgggc agaatatgtg gggaaaggaa aaagaaaaca agaccaccaa 2400
 atgaaataat gaaggtacag gcctcgcgtg tgccagacac agtaggcgct caatcagtat 2460
 tagttcccac cattcccctt ttcttgtgtt ccttcttgtt ggtttctga agtcctattt 2520
 gaagacagtg gtttatttcc ccctctctat ccogtcaaat tcaccttaa taacaccag 2580
 ctagatacag gcaactagggt tgtgtaagat atgttgatac acacgaacaa agtttatttt 2640
 gactataatg tgtggactga ctttcaacat ttgcatttta tctcacaag gtgtatctat 2700
 tcaagtaacc tttttttttt gtttgtttgt ttcttttttg tttttttttt tcttttggt 2760
 gtttgtttca attcatgtag ctatttaaac tgggatacct tggactaagc cagtctgtat 2820
 cccaattcgc tagcaagcct aagtttgtgg ggttttgttt ttgtttttgt tttaccttct 2880
 aatttacaag aaagaggaaa agctcttcta actgaacttt ggtatgcggt tgagctttgt 2940
 aactatttgt tctccatgaa aacaaaatta tttatatttg acatattttt ttctagtgt 3000
 ttaagttatt ttaaacaaaa gatgttatct catgacgtgt tgtcagtaca aaatgtgtcg 3060
 cctccaattc tgttaaacct tttaaataag tgccaagtta ttaattgaag acactttgcg 3120
 atcaattgaa tgaaaatatc gtttcatttg aaaaaaaaa a 3161

<210> 10

<211> 3125

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

ES 2 685 319 T3

<220>

<221> características_misc

<223> Homo sapiens short stature homeobox 2 (SHOX2), variante de transcripción 3

<220>

5 <221> características_misc

<223> Número de acceso - NM_001163678.1

<400> 10

```

cctcctccct ctctcccc acctcctgtc ccattgatgt gttattattg ggggggctgg      60
agcagtaaaa aaagaagaag gaaaaaaga gcggggctct gctggcagag gttgagcgcc      120
gggctgacgt gcggcggcga tgaagaact tacggcgctc gtctccaagt cttttgacca      180
gaaagtgaag gagaagaagg aggcgatcac gtaccgggag gtgctggaga gcgggccgct      240
gcgcgggggc aaggagccga ccggctgcac cgaggcgggc cgcgacgacc gcagcagccc      300
ggcagtccgg gcgccggcg gagggcgcg cggaggaggc ggaggcgcg gcggaggagg      360
cggaggaggt gtaggaggag gaggagcagg cggaggagct ggaggagggc gctctcccgt      420
ccgggagctg gacatgggcg ccgccgagag aagcaggag ccgggcagcc cgcgactgac      480
ggaggtgtcc ccggagctga aagatcgcaa agaggatgag aaagggatgg aggacgaagg      540
ccagaccaa atcaagcaga ggcgaagtcg gaccaatttc accctggaac aactcaatga      600
gctggagagg ctttttgacg agaccacta tcccgcgcc ttcctgcgag aggaactgag      660
ccagcgactg ggcctgtcgg aggcccaggt gcaggttgg tttcaaatc gaagagctaa      720
atgtagaaaa caagaaatc aactccataa aggtgtctc ataggggccc ccagccagtt      780
tgaagcttgt agagtcgcac cttatgtcaa cgtagtgct ttaaggatgc catttcagca      840
ggttcaggcg cagctgcagc tggacagcgc tgtggcgcac gcgcaccacc acctgcatcc      900
gcacctggcc gcgcacgcbc cctacatgat gttcccagca ccgcccttcg gactgccgct      960
cgccacgctg gcccggtatt cggcttcgcb cgcctcggtg gtggcgccg cagcagccgc      1020
caagaccacc agcaagaact ccagcatcgc cgatctcaga ctgaaagcca aaaagcacgc      1080
cgcagccctg ggtctgtgac gccaacgcc gaccaatgt cgcgcctgtc ccgcgccact      1140
cagcctgcac gccctccgcb ccccgctgct tctccgttac ccctttgaga cctcgggagc      1200
cgccctctt ccgcctcac tgaccatccc tcgtccccta tcgcatcttg gactcggaaa      1260
gccagactcc acgcaggacc agggatctca cgaggcacgc aggctccgtg gctcctgccc      1320
gttttcttac tcgagggcct agaattgggt tttgtaggag cgggtttggg ggagtctgga      1380
gagagactgg acaggggagt gctggaaccg cggagtgttg ctcaccgcaa agctgcaacg      1440
atggactctt gcatagaaaa aaaaatcttg ttaacaatga aaaaatgagc aaacaaaaaa      1500
atcgaaagac aaacgggaga gaaaagagg aagggaactt atttottaac tgctatttgg      1560
cagaagctga aattggagaa ccaaggagca aaaacaaatt ttaaaattaa agtattttat      1620

```

ES 2 685 319 T3

acatttaaaa	atatggaaaa	acaaccacaga	cgattctcga	gagactgggg	ggagttacca	1680
acttaaatgt	gtgtttttaa	aaatgcgcta	agaaggcaaa	gcagaaagaa	gaggtatact	1740
tatttaaaaa	actaagatga	aaaaagtgcg	cagctgggaa	gttcacaggt	tttgaaactg	1800
acctttttct	gcgaagttca	cgtaaacacg	agaaatttga	tgagagaggc	gggcctcctt	1860
ttacgttgaa	tcagatgctt	tgagtttaaa	cccaccatgt	atggaagagc	aagaaaagag	1920
aaaatattaa	aacgaggaga	gagaaaaata	atattaacac	aaaaaatgc	cacagacaat	1980
gatttctctg	agaaattatt	atggcaaaac	tgtctggact	gctgacagta	aattccggtt	2040
tgcatgttac	ttgtattcca	ttgatggtgt	gtctcctccc	accccttat	ctcccatgca	2100
ctcactccat	ttcatcttc	actatgaaaa	acaataccaa	aagtatctgg	aaattgatat	2160
atatatatcc	atatatatat	atcatatatt	tgccatatat	atatatatat	atatatatat	2220
atatatatat	atatatttgc	cctgtctttg	atcctgggga	acaaaagaaa	aaagtcagaa	2280
agggaaaaaaa	ttacactcat	tgtcctaaga	agacagaggt	gggcagaata	tgtggggaaa	2340
ggaaaaagaa	aacaagacca	ccaaatgaaa	taatgaaggt	acagcgctc	gctgtgccag	2400
acacagtagg	cgctcaatca	gtattagttc	ccaccattcc	ccttttcttg	tgttccttct	2460
tgttggtttc	ctgaagtcct	atttgaagac	agtggtttat	ttccccctct	ctatcccgtc	2520
aaattcacct	taaataacac	ccagctagat	acaggcacta	ggtttgtgta	agatatgttg	2580
atacacacga	acaaagttha	ttttgactat	aatgtgtgga	ctgactttca	acatttgcac	2640
tttatctcac	aaaggtgat	ctattcaagt	aacctttttt	ttttgtttgt	ttgtttcttt	2700
tttgtttttt	tttttctttt	ggttgtttgt	ttcaattcat	gtagctattt	aaactgggat	2760
accttgagct	aagccagtct	gtatcccaat	tcgctagcaa	gcctaagttt	gtggggtttt	2820
gtttttgttt	ttgttttacc	ttctaattta	caagaaagag	gaaaagctct	tctaactgaa	2880
ctttggtatg	cggttgagct	ttgtaactat	ttgttctcca	tgaaaacaaa	attatttata	2940
tttgacatat	tttttctag	tgtattaagt	tattttaaac	aaaagatggt	atctcatgac	3000
gtggtgtcag	tacaaaatgt	gtcgcctcca	attctgttaa	accttttaa	taagtgccaa	3060
gttattaatt	gaagacactt	tgcatcaat	tgaatgaaaa	tatcgtttca	tttgaaaaaa	3120
aaaaa						3125

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende Tbx18 o fragmentos funcionales del mismo capaces de convertir células quiescentes o células madre en células marcapasos para su uso como medicamento para tratar a un sujeto afectado con una afección seleccionada del grupo que consiste en arritmia cardíaca, síndrome del seno enfermo, bloqueo AV, bradicardia, taquicardia o insuficiencia cardíaca.
- 10 2. Una composición que comprende un sistema de administración de ADN; comprendiendo dicho sistema de administración un polinucleótido que codifica Tbx18 o un fragmento funcional del mismo capaz de convertir células quiescentes o células madre en células marcapasos, para uso como medicamento para tratar un sujeto que tiene una afección seleccionada de arritmia cardíaca, síndrome del seno enfermo, bloqueo AV, bradicardia, taquicardia o insuficiencia cardíaca.
3. La composición según la reivindicación 2, en la que el sistema de administración de ADN comprende un vector viral.
4. La composición según la reivindicación 3, en la que el vector viral se selecciona del grupo que consiste en adenovirus, virus adenoasociado, lentivirus, retrovirus, HJV, HIV y HSV.
- 15 5. La composición según la reivindicación 4, en la que el vector viral es un adenovirus y comprende los siguientes componentes enlazados operativamente en secuencia:
- una primera secuencia de repetición terminal invertida (ITR);
- un primer sitio lox P;
- un sitio de empaque (ψ , psi);
- 20 un promotor de citomegalovirus;
- una secuencia que codifica Tbx18;
- un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES);
- una señal de poliadenilación (An);
- un segundo sitio lox P;
- 25 una secuencia que codifica los genes de región temprana 2 y región temprana 4 de adenovirus; y
- una segunda secuencia de repetición invertida (ITR).
6. La composición según la reivindicación 2 en la que el sistema de administración de ADN comprende un vector no viral que se puede seleccionar de uno o más de: vectores liposomales, unos polímeros catiónicos, y/o polímeros de unión a ADN o en la que el sistema de administración de ADN comprende ADN desnudo.
- 30 7. La composición según cualquier reivindicación precedente, en la que dicha afección se debe a una arritmia cardíaca.
8. Un método in vitro de generación de un marcapasos biológico usando Tbx18 o fragmentos funcionales del mismo capaz de convertir células quiescentes o células madre para células marcapasos, y para modificar la actividad eléctrica del tejido cardíaco derivada de un sujeto que comprende:
- 35 administrar Tbx18 o un fragmento funcional del mismo, a células quiescentes para generar células tratadas,
- en el que las células quiescentes se han obtenido de un sujeto que tiene tejido cardíaco que presenta actividad eléctrica anormal y dicho tejido cardíaco comprende células quiescentes;
- en el que las células quiescentes comprenden uno o más de cardiomiocitos y células madre y no presentan actividad eléctrica espontánea y repetitiva; y
- 40 en el que las células tratadas presentan actividad eléctrica repetitiva espontánea, modificando así la actividad eléctrica del tejido cardíaco de dicho sujeto.
9. El método de la reivindicación 8, en el que las células tratadas presentan:
- (i) una morfología de longitud a ancho sustancialmente similar a una morfología de longitud a ancho de células SAN nativas y la relación de longitud a ancho puede ser al menos aproximadamente 10; o
- 45 (ii) un aumento en las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} intracelular.

10. El método de la reivindicación 8, en el que dicha actividad eléctrica espontánea y repetitiva aumenta en respuesta a la estimulación β -adrenérgica.
11. El método de la reivindicación 8, en el que las células convertidas no expresan el péptido natriurético auricular (ANP) o la α -actina esquelética (α SkA).
- 5 12. Un método in vitro para convertir una población de células madre mediante el uso de Tbx18 o fragmentos funcionales del mismo capaces de convertir células quiescentes o células madre en células marcapasos, en células apropiadas para la generación de un marcapasos biológico, que comprende:
- cultivo de una población de células madre in vitro;
- 10 en el que dichas células madre cultivadas comprenden células quiescentes que no presentan actividad eléctrica repetitiva espontánea;
- administración de uno o más factores de transcripción a dichas células quiescentes para generar células convertidas,
- en el que las células convertidas presentan actividad eléctrica espontánea y repetitiva; convirtiendo así dichas células madre en células capaces de generar un marcapasos biológico.
- 15 13. Un método según la reivindicación 12, en el que dicha administración comprende administrar a dichas células quiescentes un sistema de administración de ADN que comprende un polinucleótido que codifica dichos uno o más factores de transcripción.
14. El método de la reivindicación 13, en el que el sistema de administración de ADN es una composición definida por cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.
- 20 15. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el sujeto y/o las células madre son mamíferos y preferiblemente humanos
16. Una composición que comprende células convertidas según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 para usar en el tratamiento de un sujeto que padece una disfunción en la actividad eléctrica cardíaca, en el que dichas células convertidas presentan actividad eléctrica espontánea y repetitiva, tratando así dicha disfunción en la actividad eléctrica cardíaca.
- 25 17. La composición para su uso según la reivindicación 16 para uso en un sujeto que tiene un marcapasos implantado.
18. La composición para su uso según cualquier reivindicación precedente, en la que dicho sujeto padece una afección seleccionada del grupo que consiste en arritmia cardíaca, síndrome del seno enfermo, bradicardia sinusal, síndrome de taquicardia-bradicardia, bloqueo auriculoventricular e insuficiencia cardíaca.
- 30 19. La composición para su uso según cualquier reivindicación anterior para la administración a un sitio seleccionado del grupo que consiste en el ápice del corazón, la rama derecha del haz de His, la rama izquierda del haz de His, las fibras de Purkinje, el tabique interventricular, la pared libre del ventrículo derecho, la pared libre del ventrículo izquierdo, el nódulo SA, el nódulo AV, el ventrículo derecho o a través de la aurícula derecha.
- 35 20. Una población de células con actividad eléctrica espontánea y repetitiva para la generación de un marcapasos biológico que comprende:
- una pluralidad de células madre, en las que las células madre se han puesto en contacto con Tbx18 o un fragmento funcional del mismo capaz de convertir células quiescentes o células madre en células marcapasos,
- 40 en el que dichos uno o más factores de transcripción inducen un aumento en la actividad eléctrica espontánea y repetitiva de dichas células,
- en el que dicho aumento en la actividad eléctrica espontánea y repetitiva de dichas células es capaz de generar una contracción ectópica de dichas células, y
- en el que dichas células madre son apropiadas para la administración a un sujeto que necesita una función de marcapasos biológico.
- 45 21. La población de células de la reivindicación 20, en la que las células madre se seleccionan del grupo que consiste en células madre embrionarias, células madre no embrionarias, células madre derivadas de médula ósea, células madre derivadas de tejido adiposo, células madre pluripotentes inducidas y células madre cardíacas.

SAN de rata neonatal

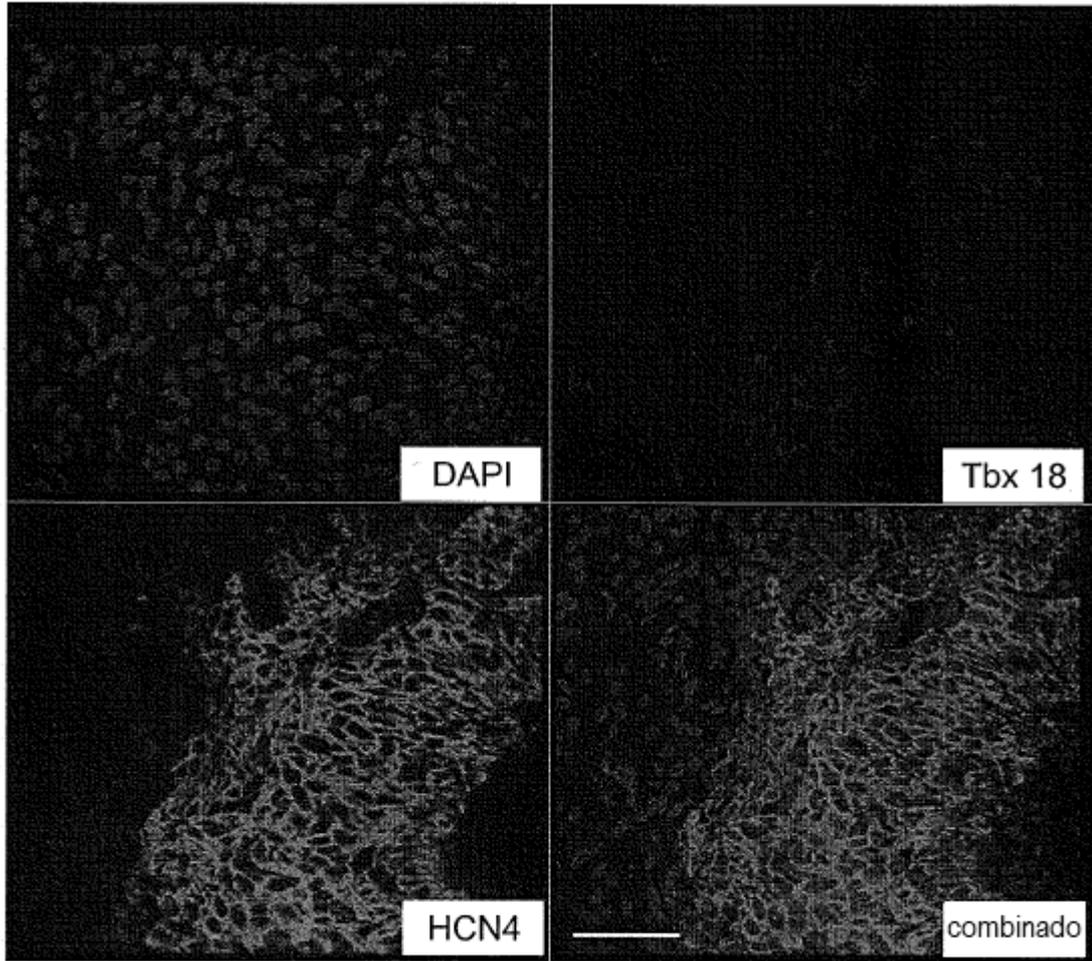


FIG. 1A

SAN de rata adulta

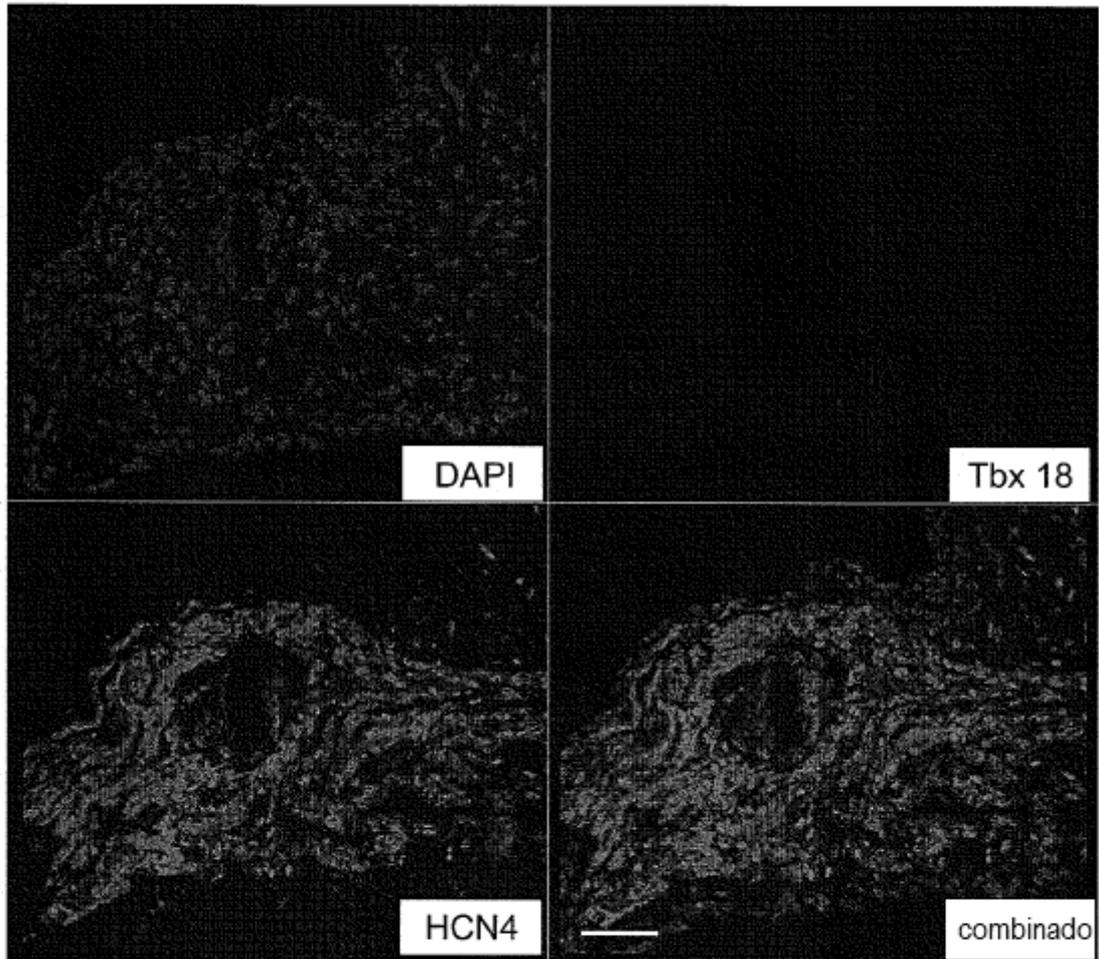


FIG. 1B

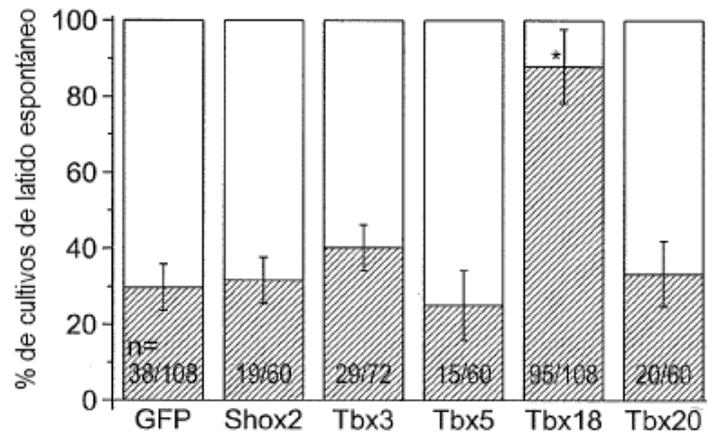


FIG. 2A

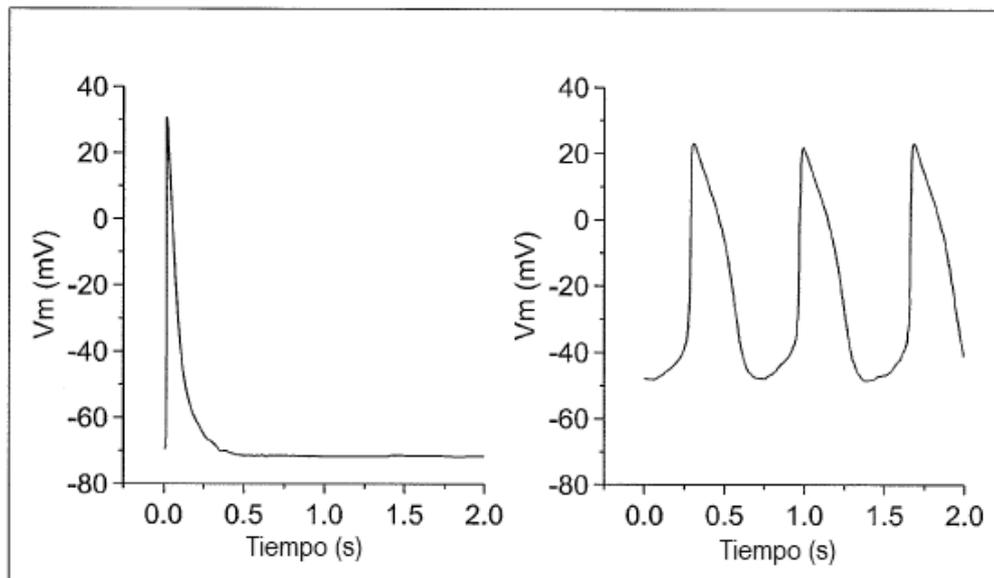


FIG. 2B

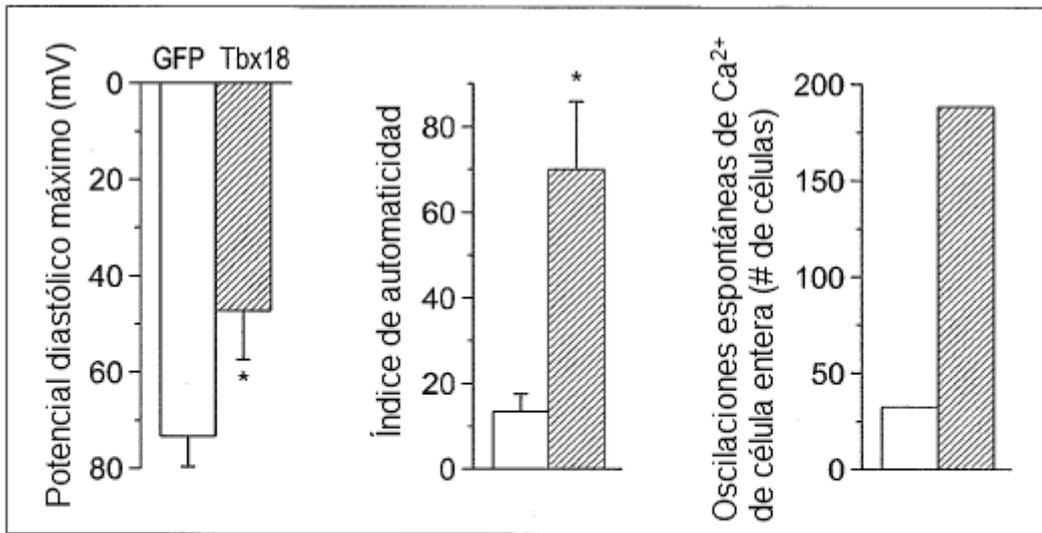


FIG. 2C

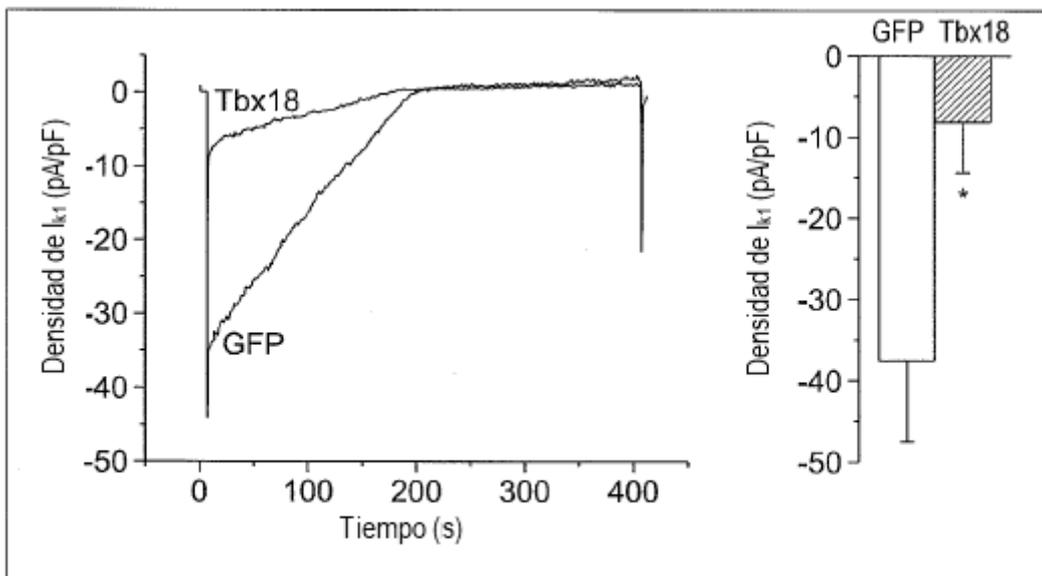


FIG. 2D

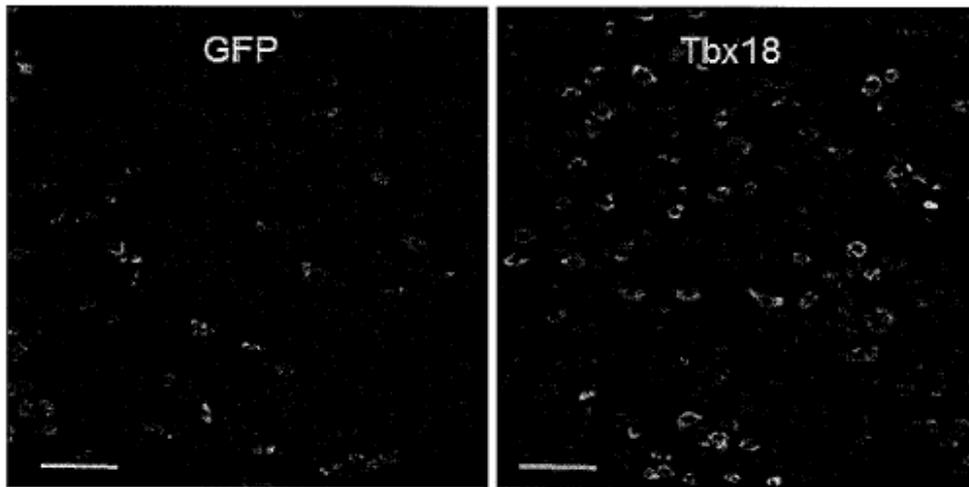


FIG. 2E

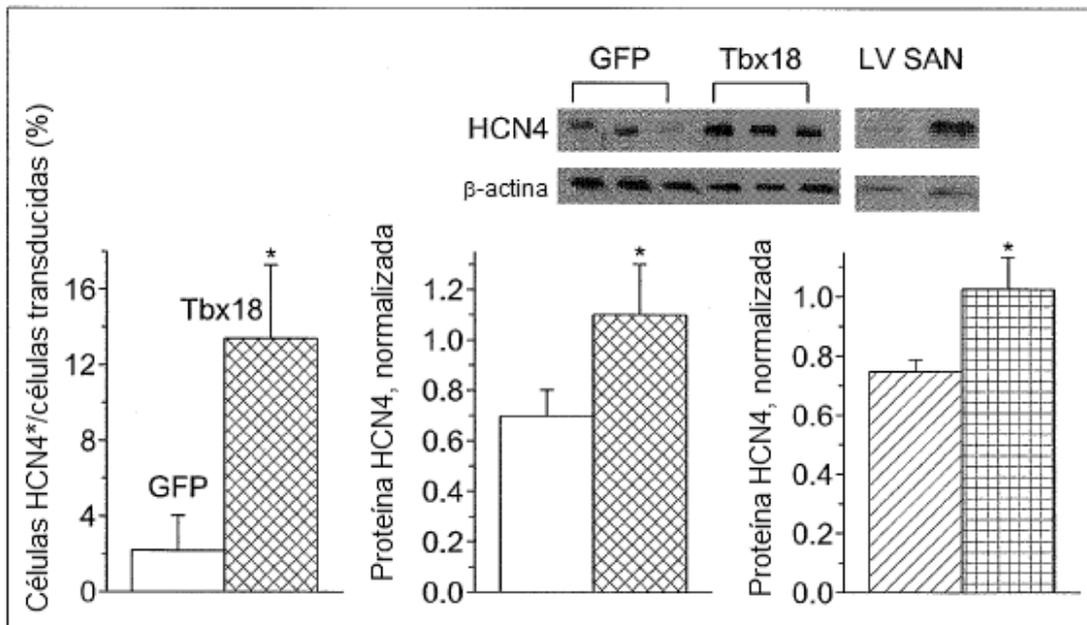


FIG. 2F

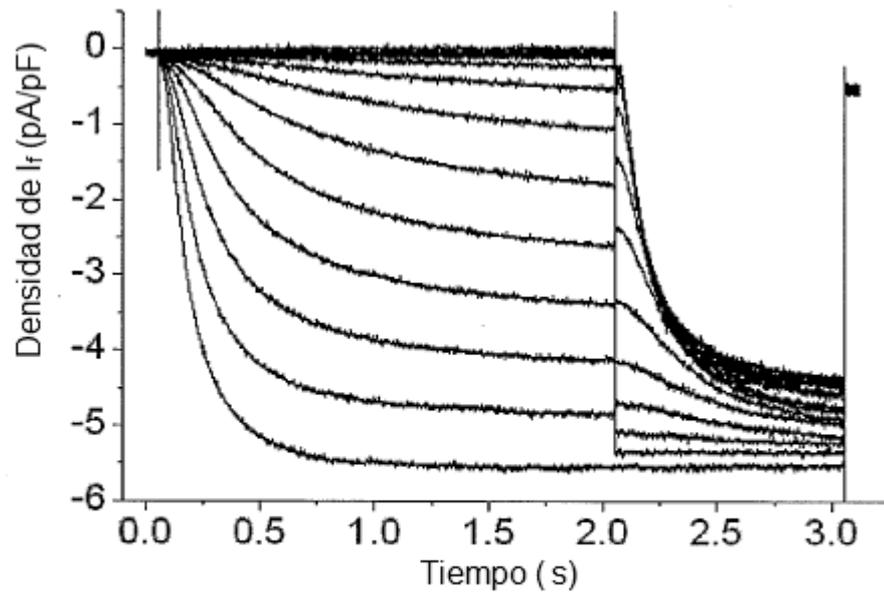


FIG. 2G

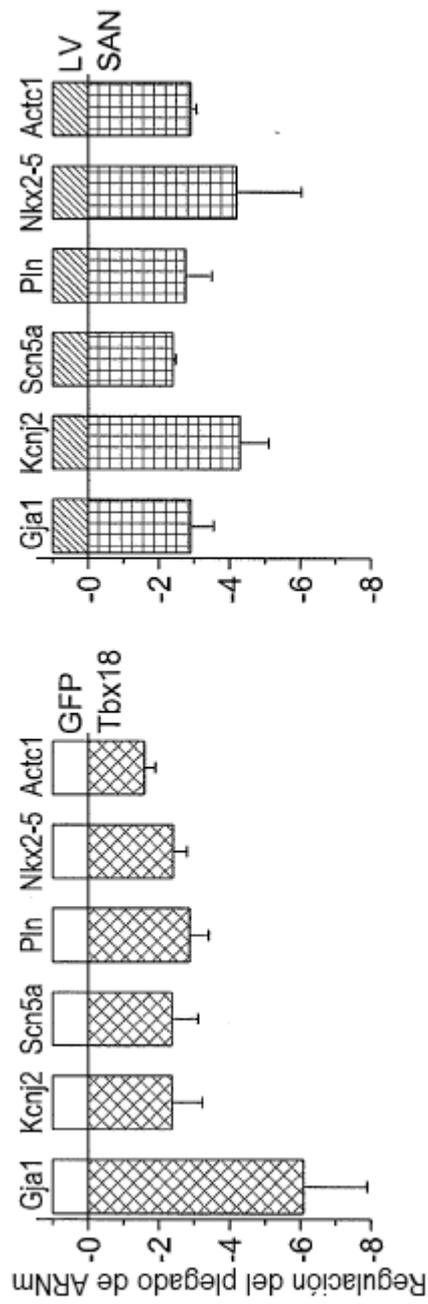


FIG. 2H

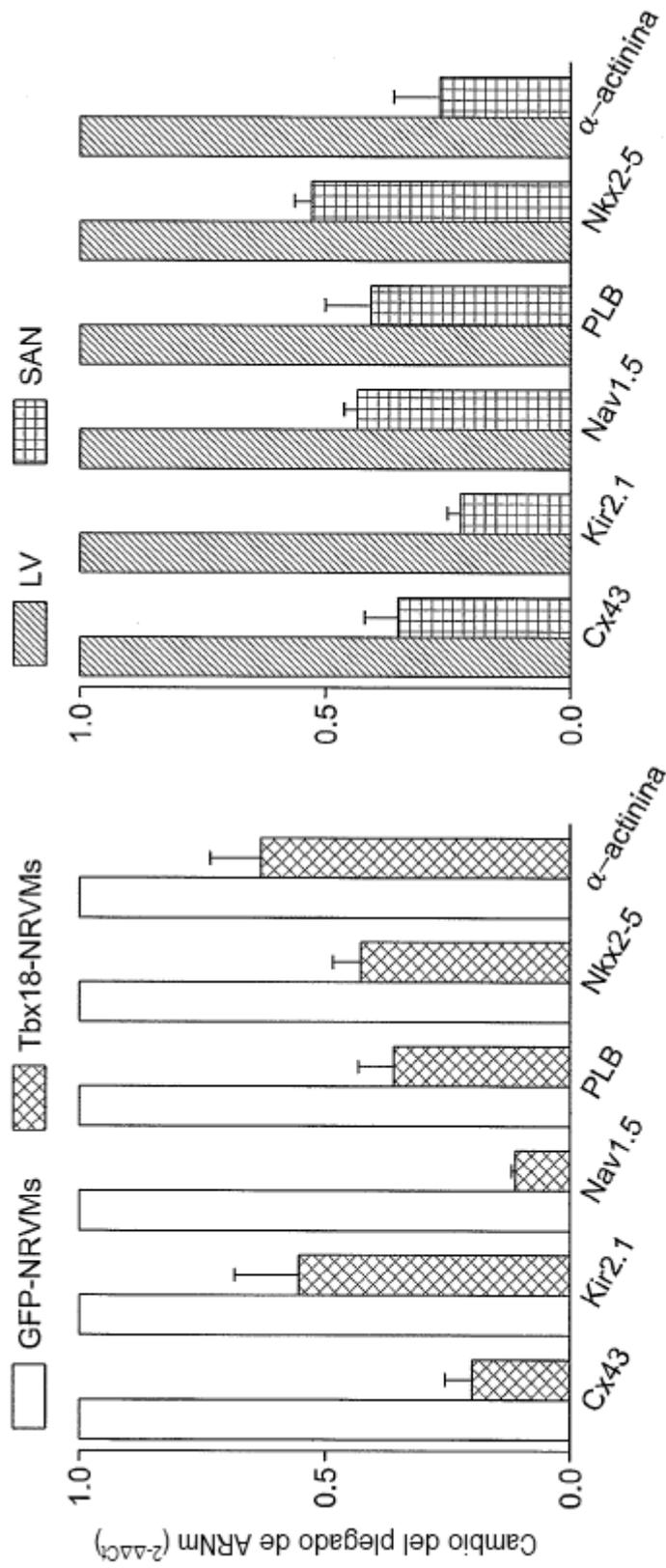


FIG. 2I

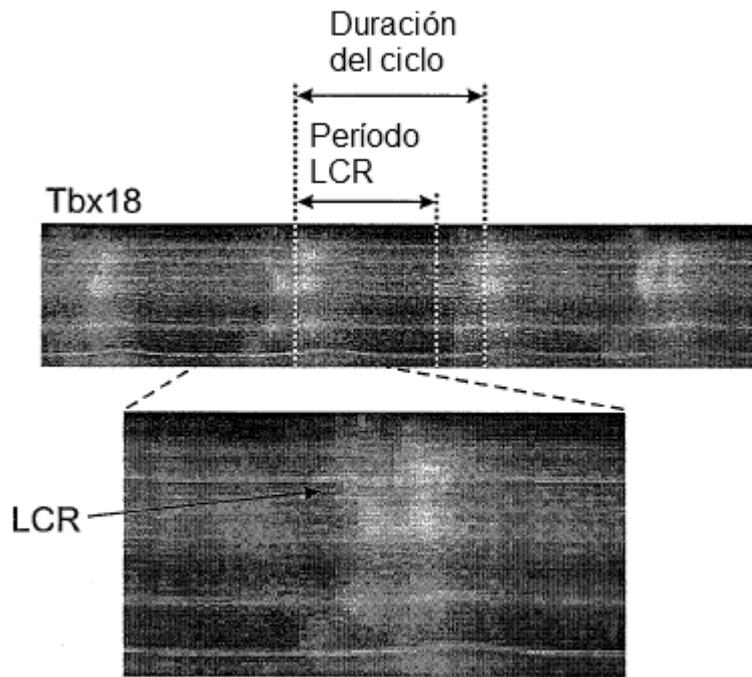


FIG. 3A

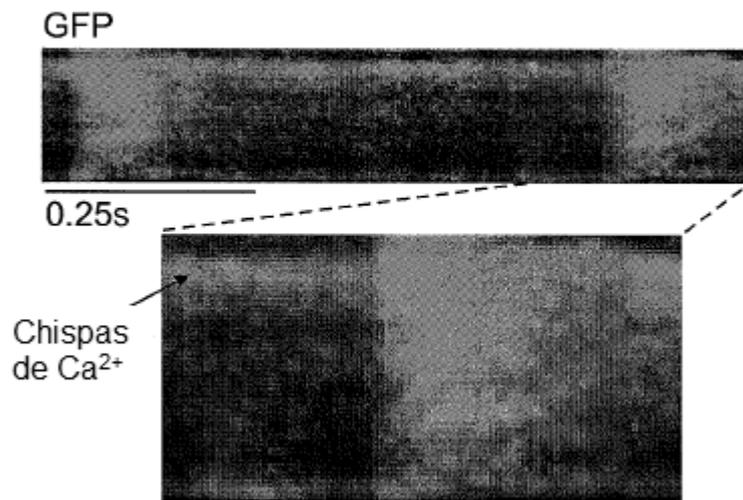


FIG. 3B

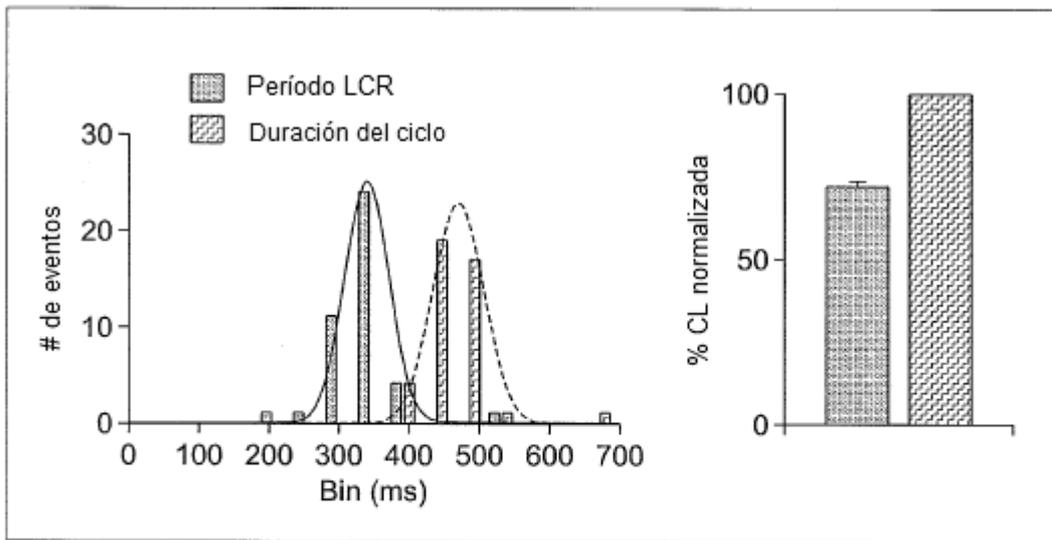


FIG. 3C

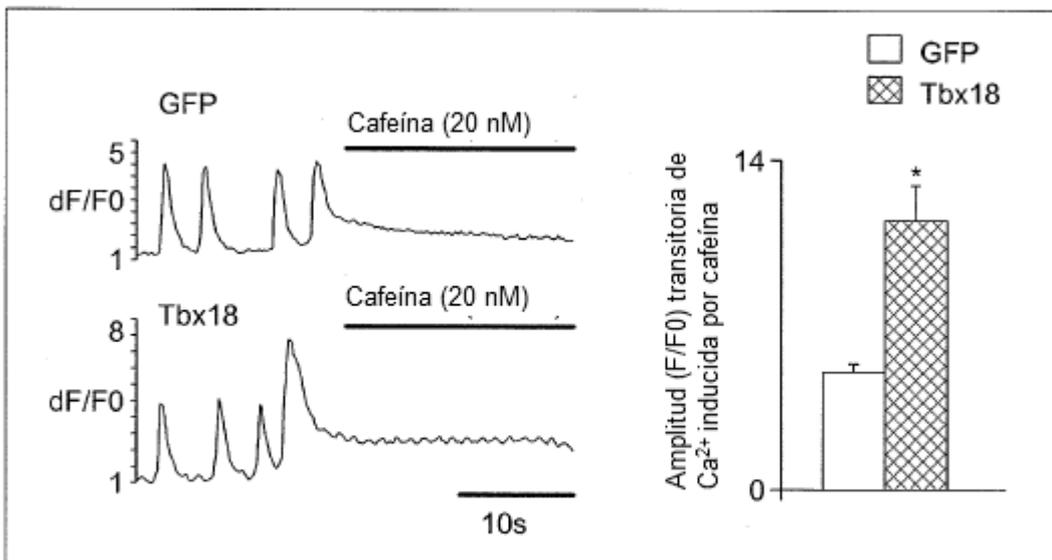


FIG. 3D

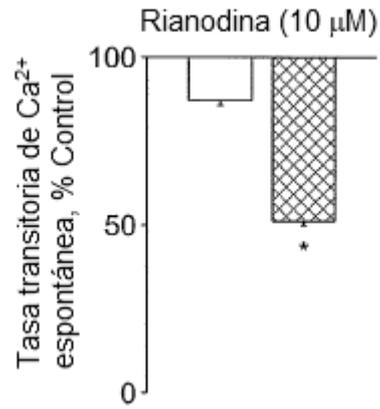


FIG. 3E

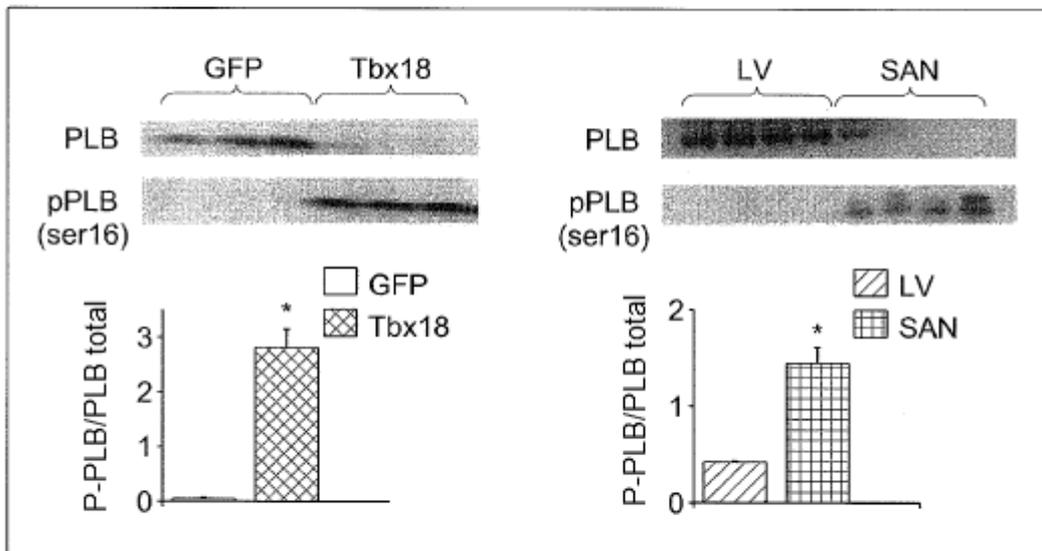


FIG. 3F

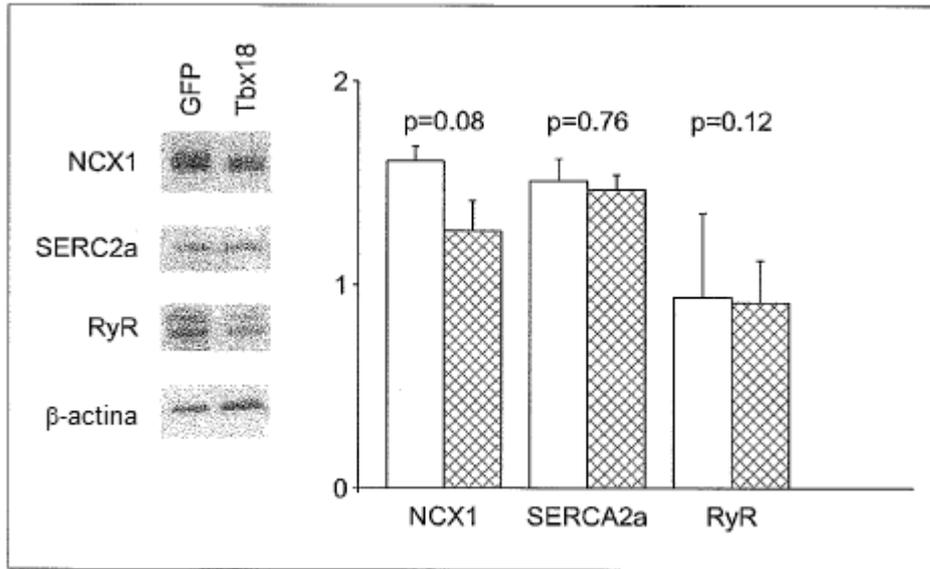


FIG. 3G

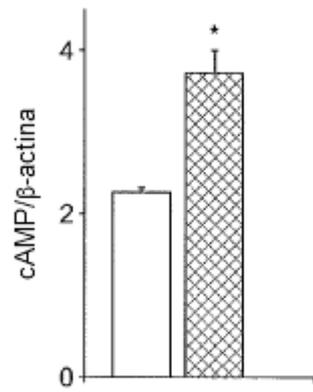


FIG. 3H

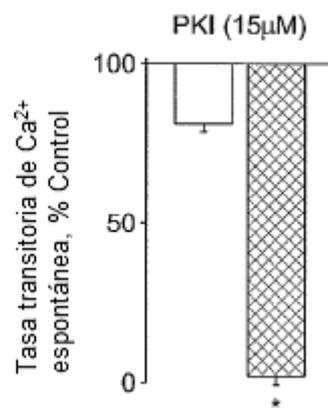


FIG. 3I

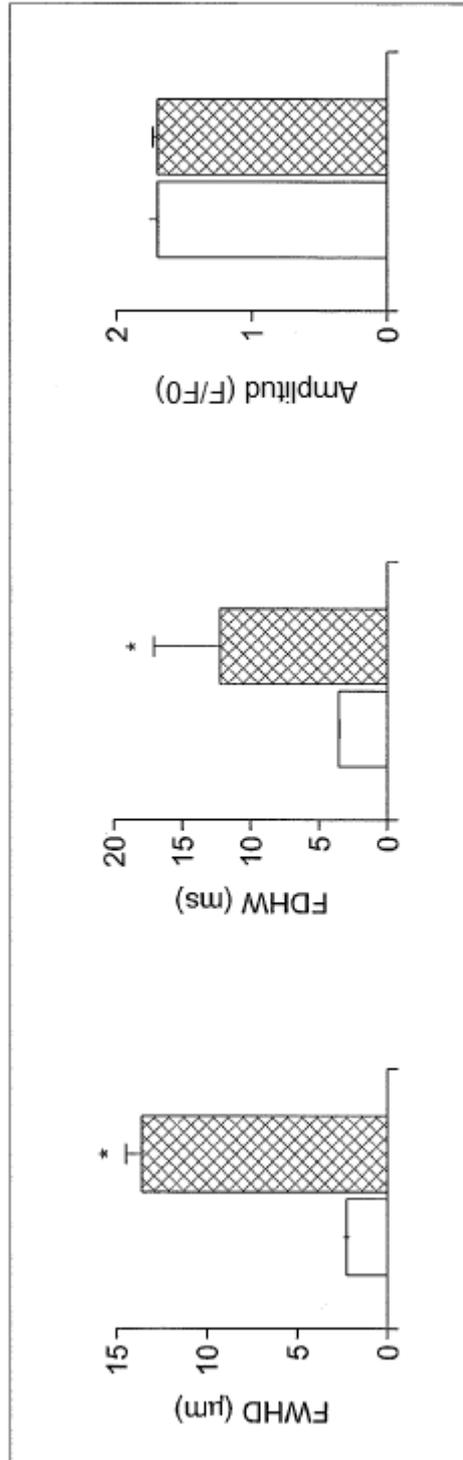


FIG. 3J

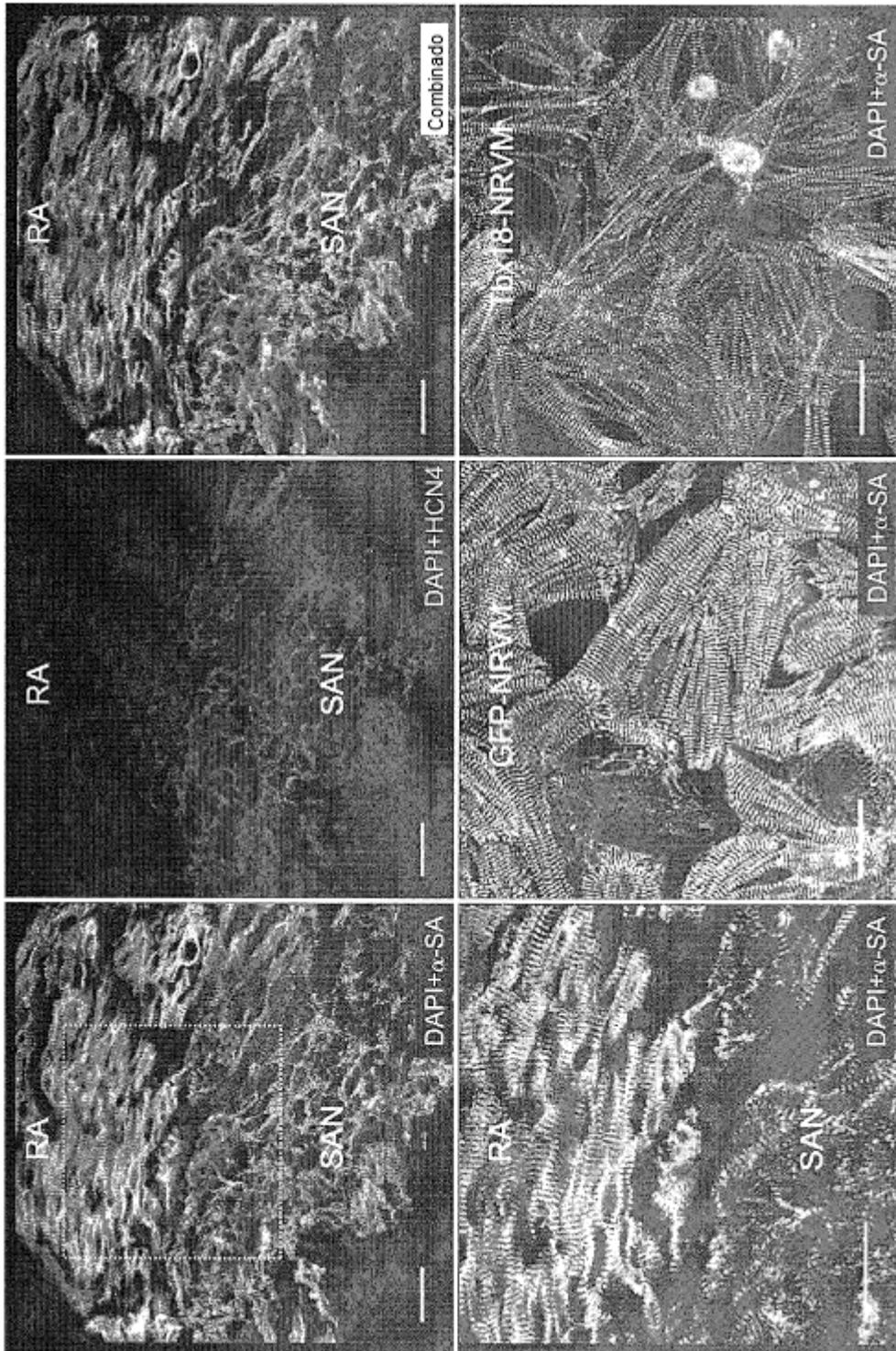


FIG. 4A

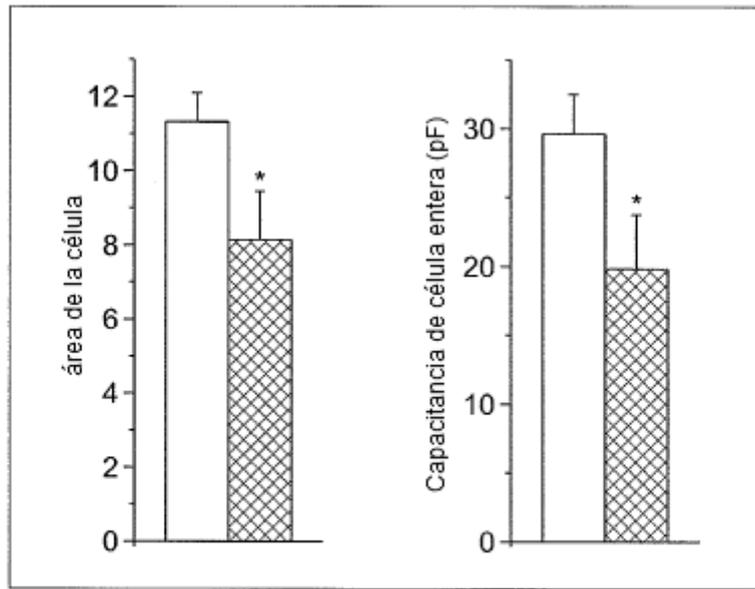


FIG. 4B

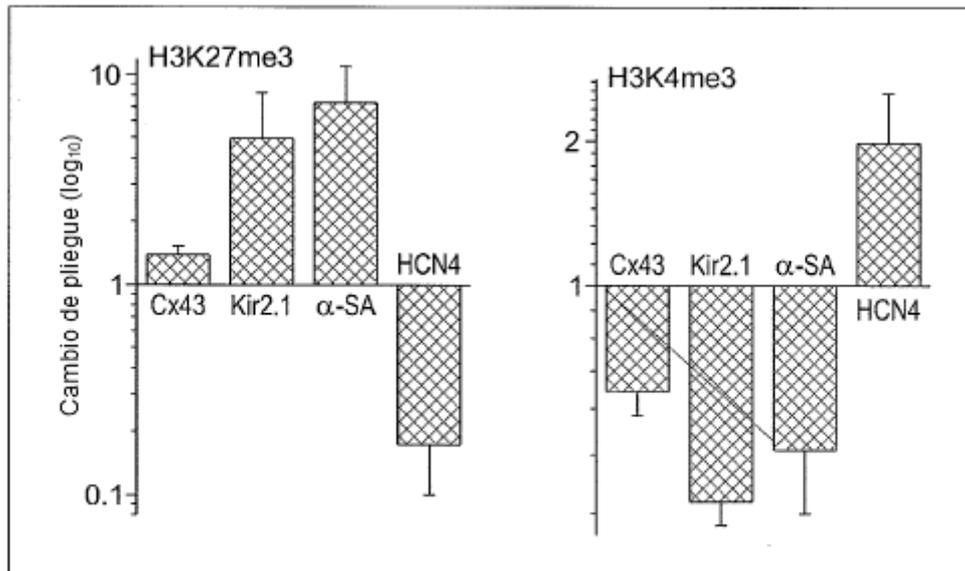


FIG. 4C

FIG. 5A

GFP-NRVMS

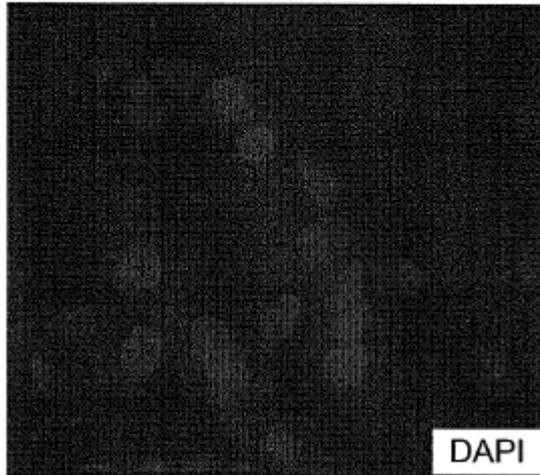
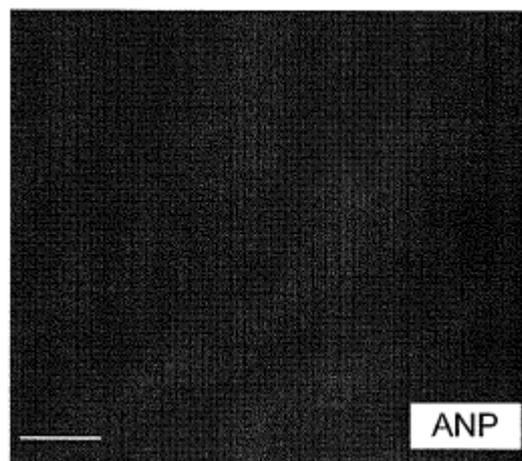
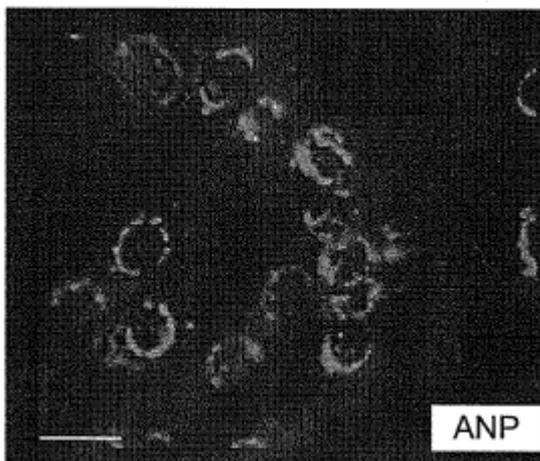
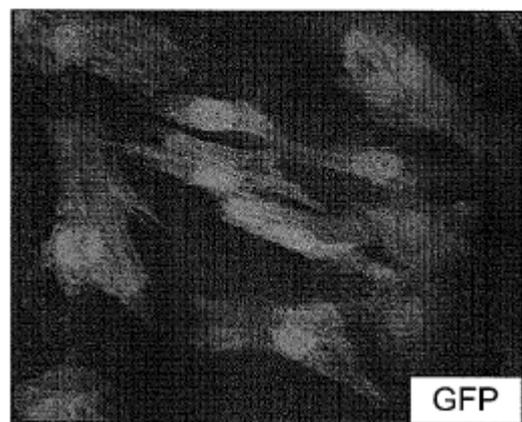
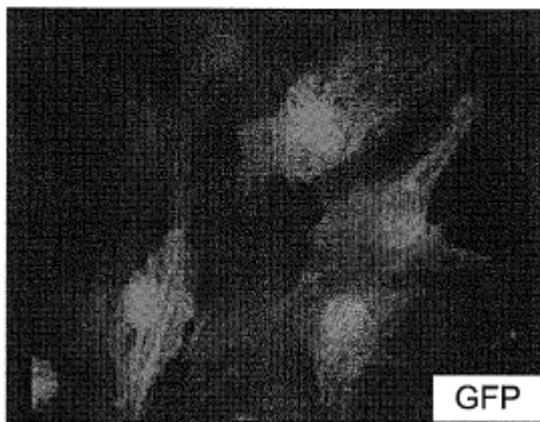
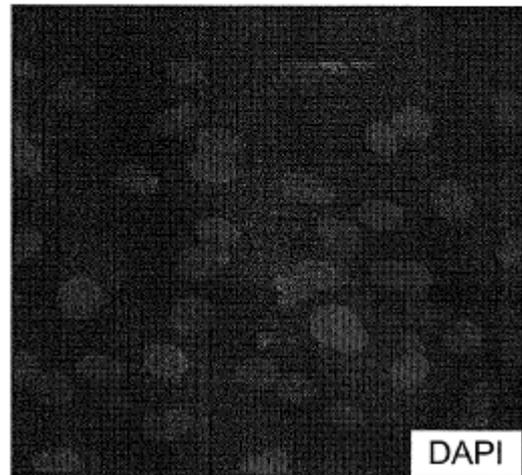


FIG. 5B

Tbx18-NRVMS



Ad-Tbx18-IRES-eGFP



Ad-eGFP

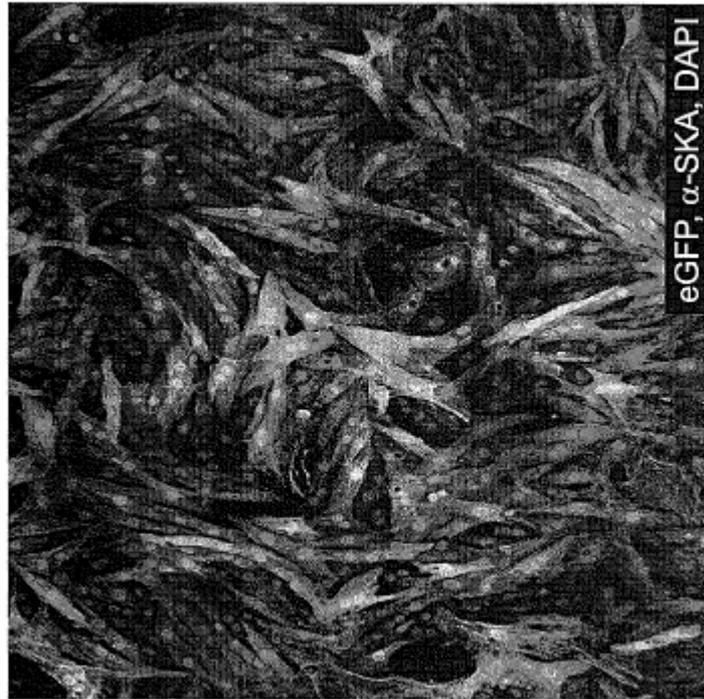


FIG. 5C

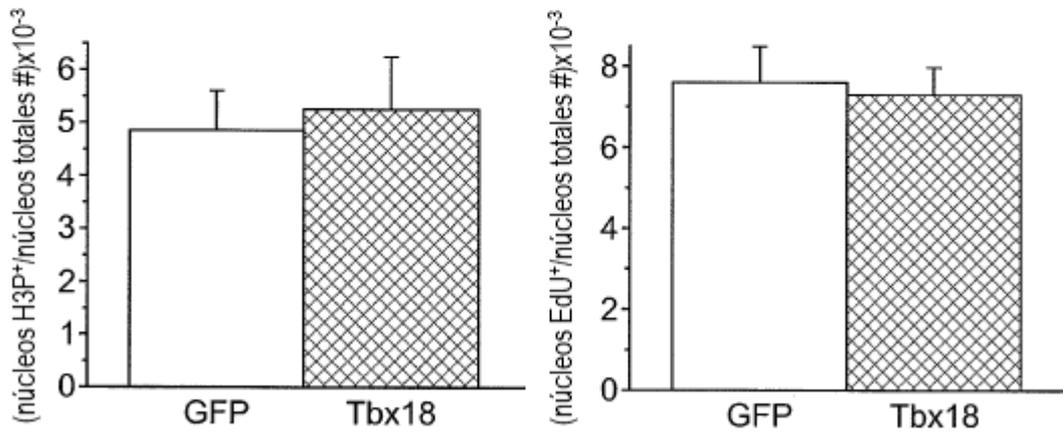
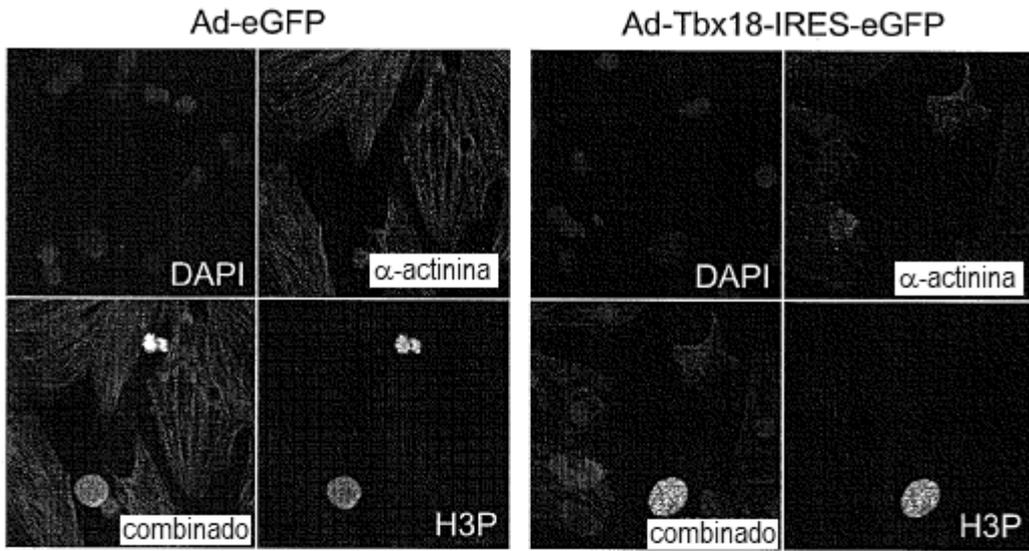


FIG. 5D

Factores de remodelación de cromatina epigenética: matriz RT-PCR

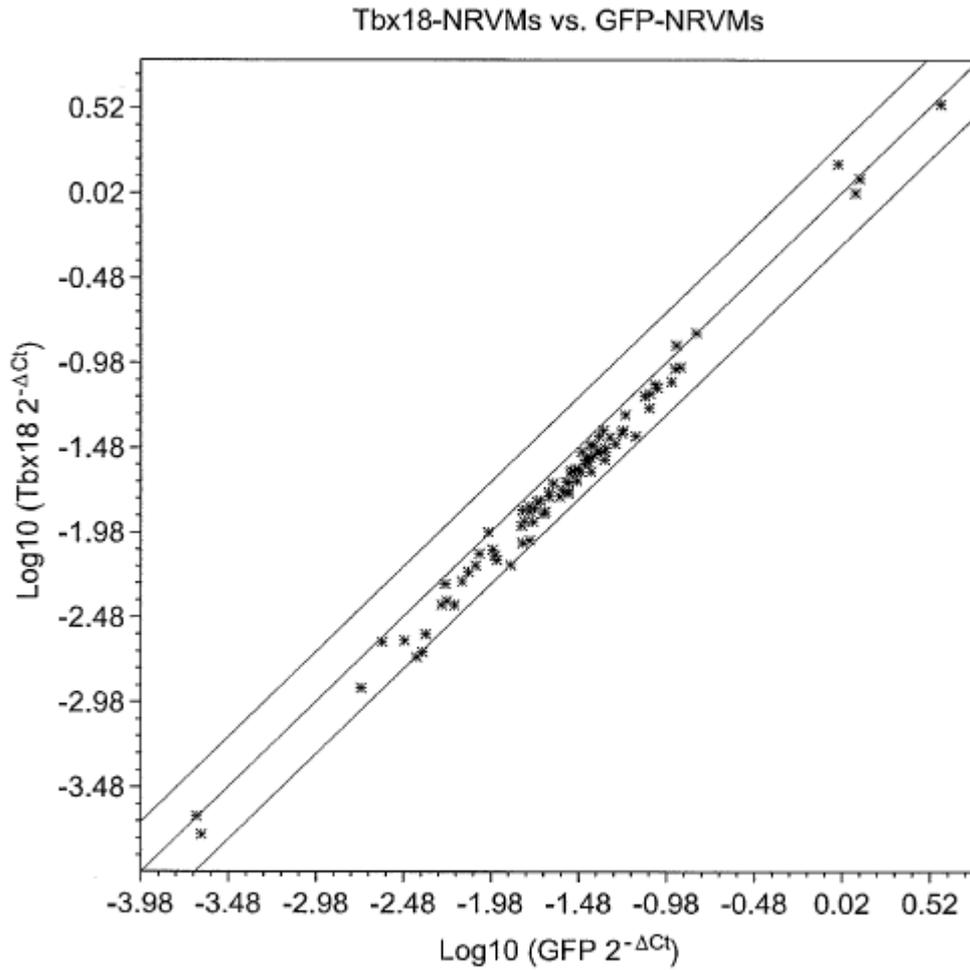


FIG. 5E

Factores de remodelación de cromatina epigenética: matriz RT-PCR

célula iPS vs. Fibs parental

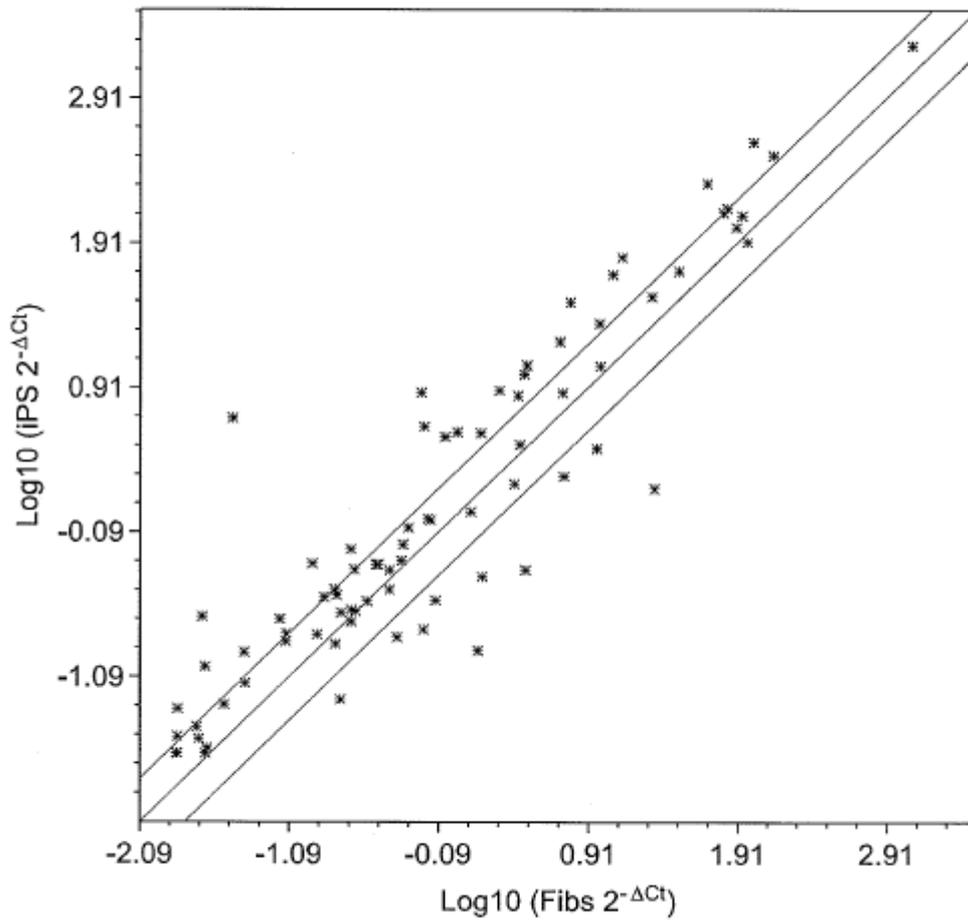


FIG. 5F

Factores de remodelación de cromatina epigenética: matriz RT-PCR

Tbx18-NRCMs vs. GFP-NRCMs

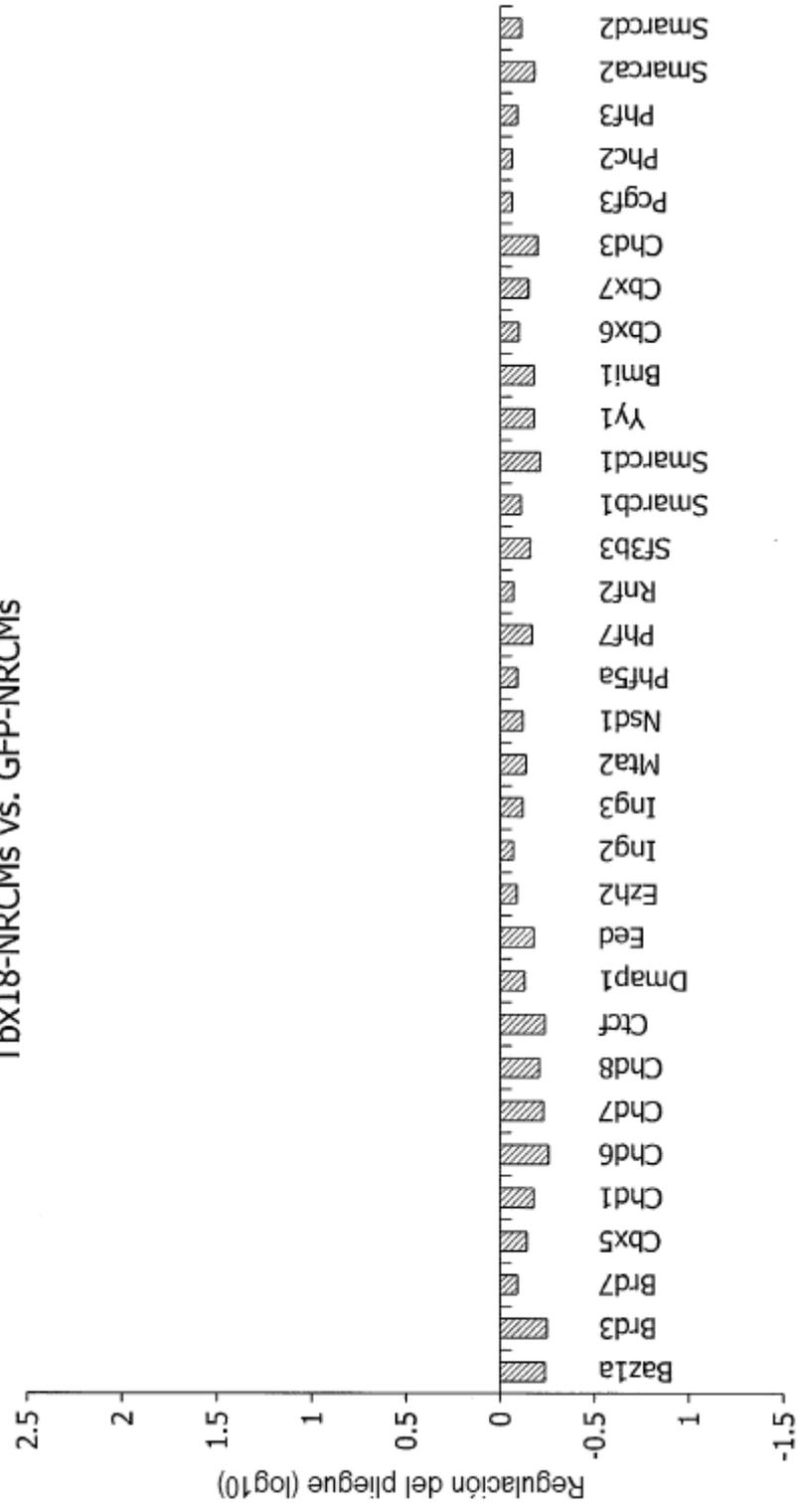


FIG. 5G

Factores de remodelación de cromatina epigenética: matriz RT-PCR

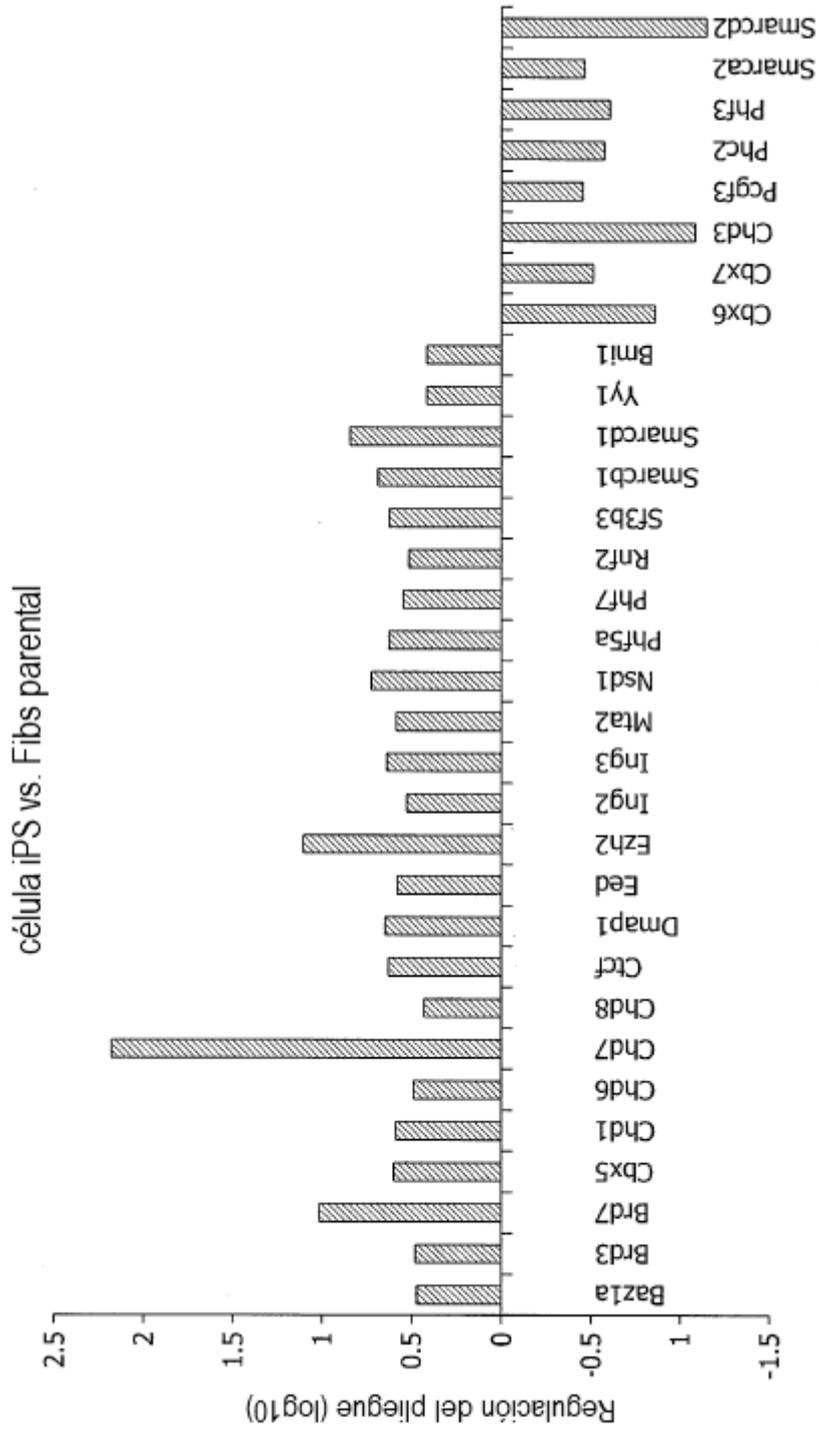


FIG. 5H

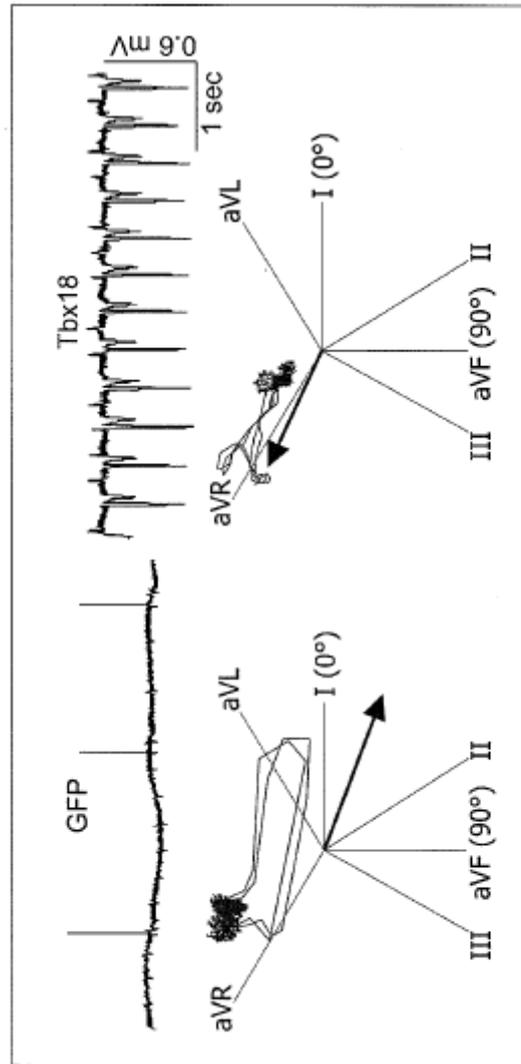


FIG. 6A

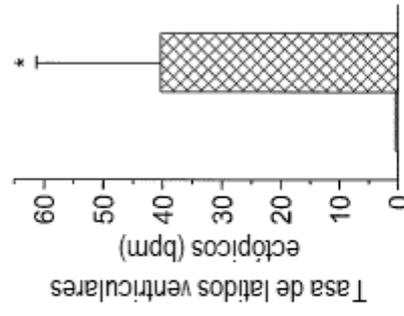
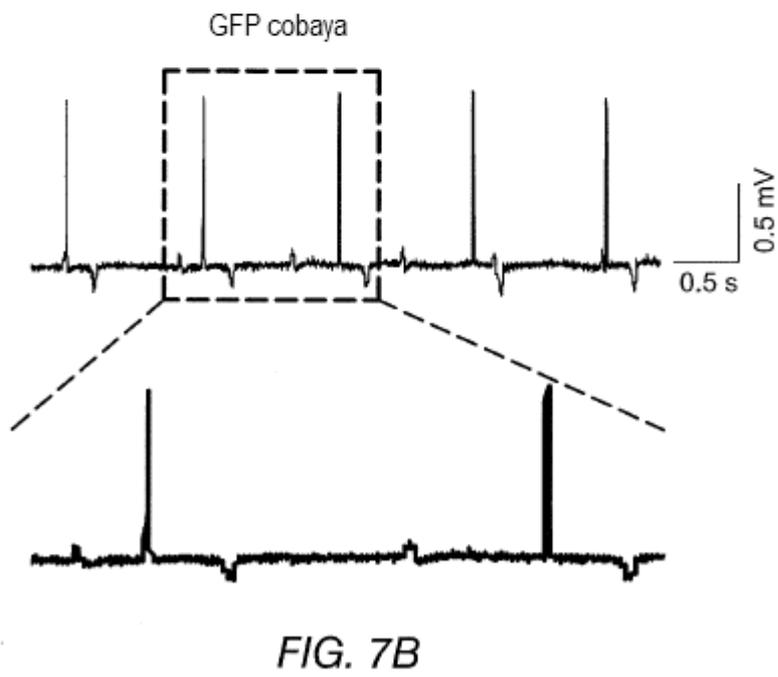
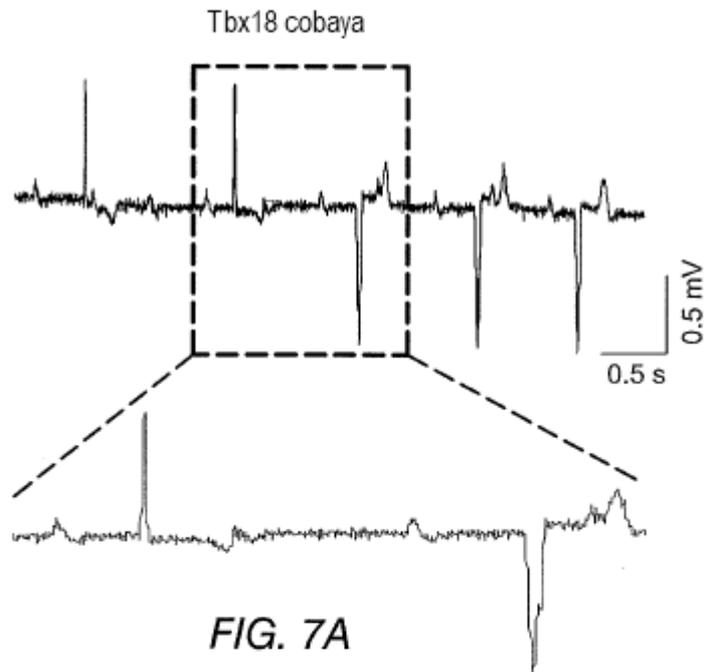


FIG. 6B



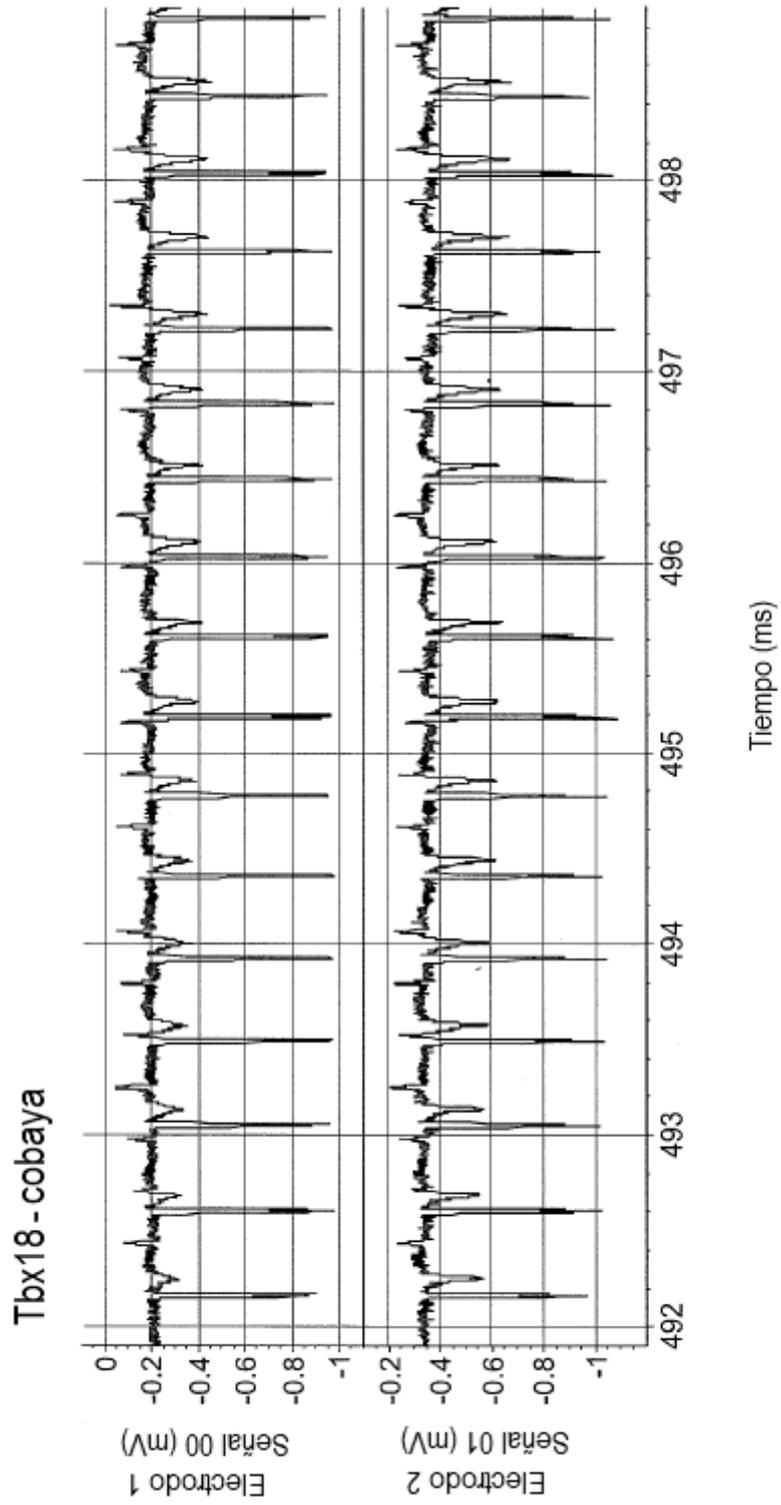


FIG. 7C

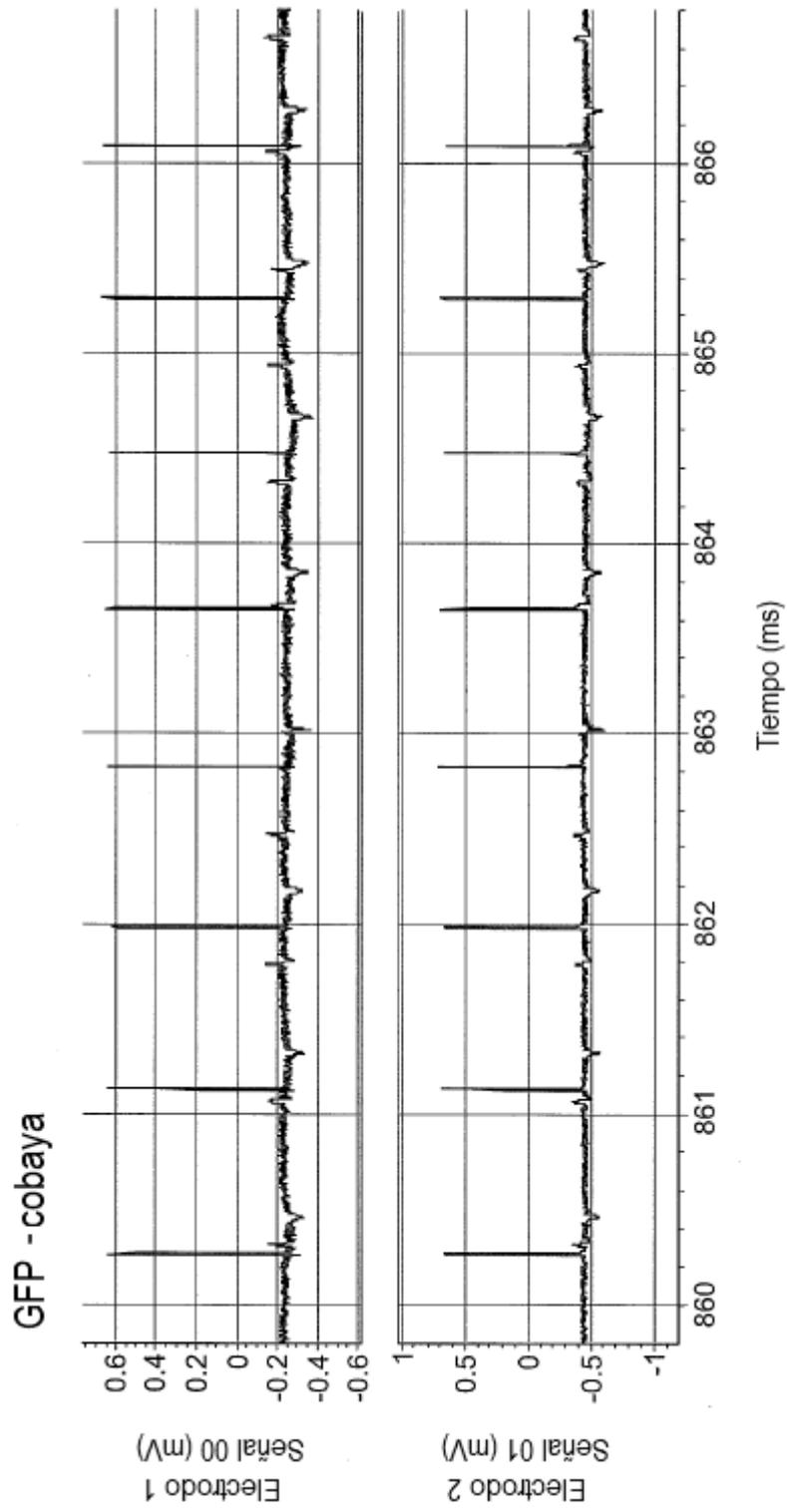


FIG. 7D

FIG. 8

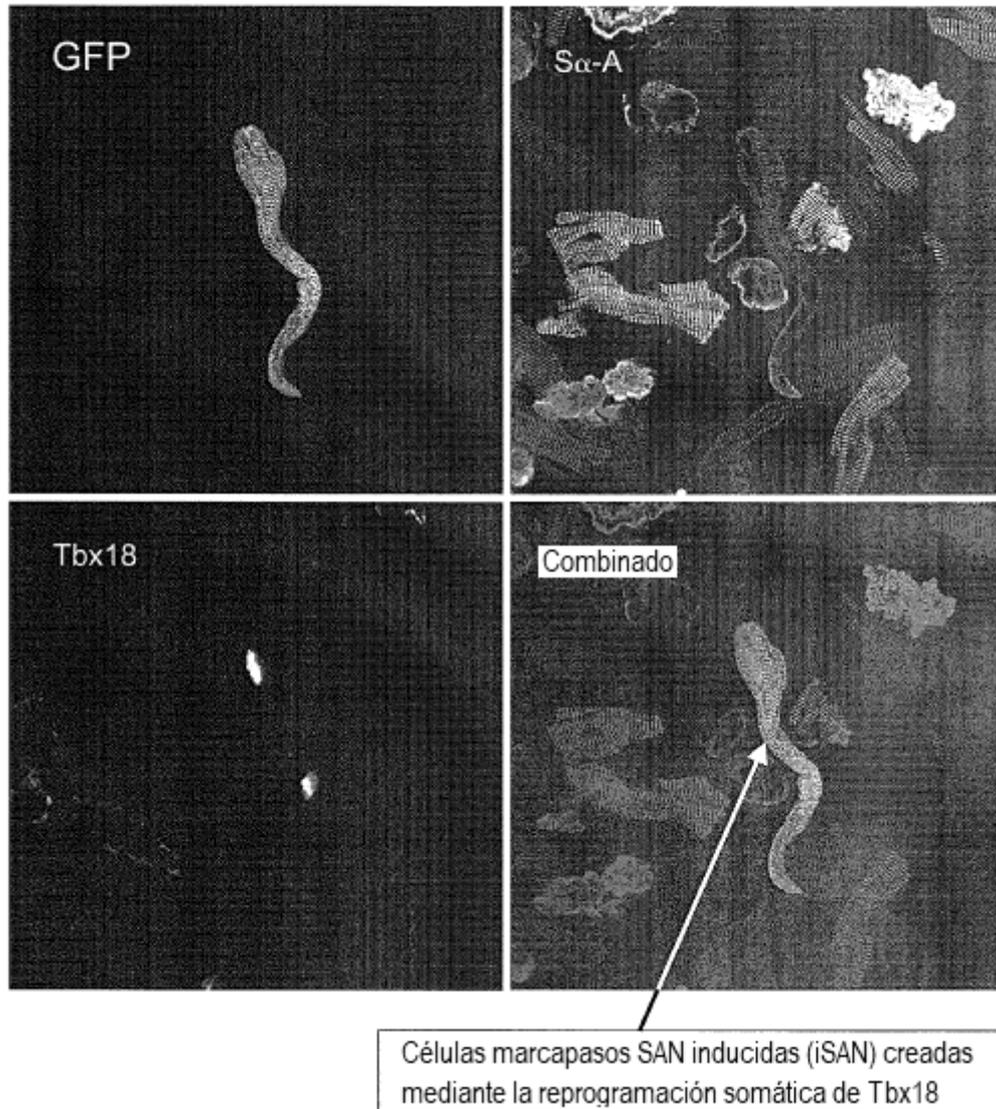
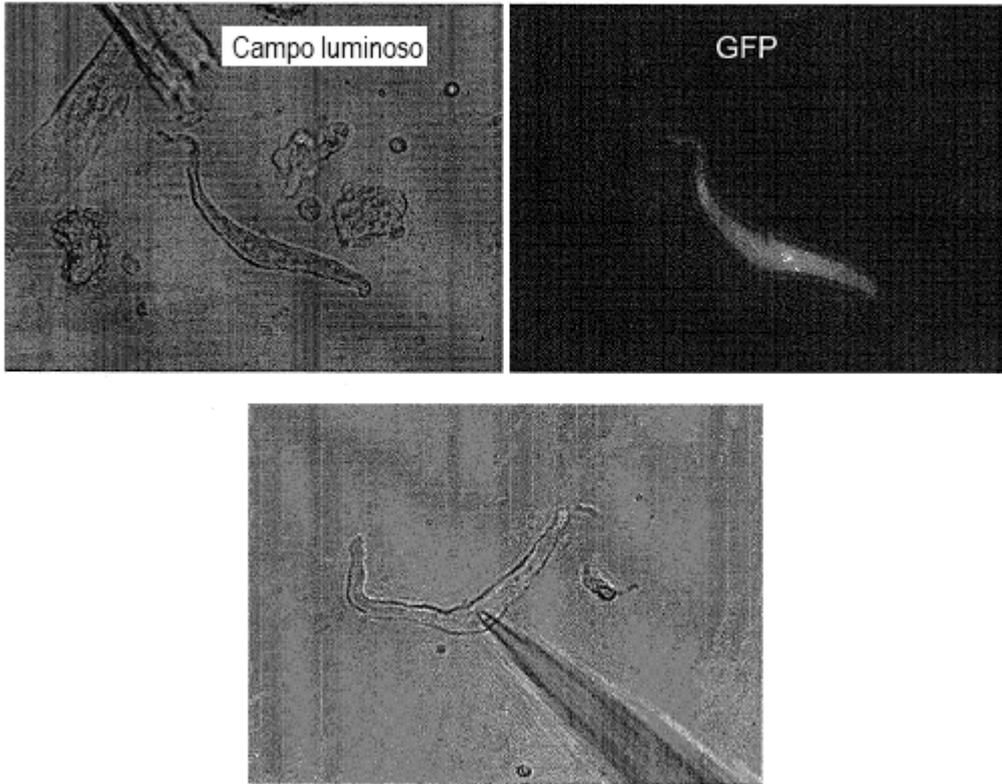


FIG. 9A



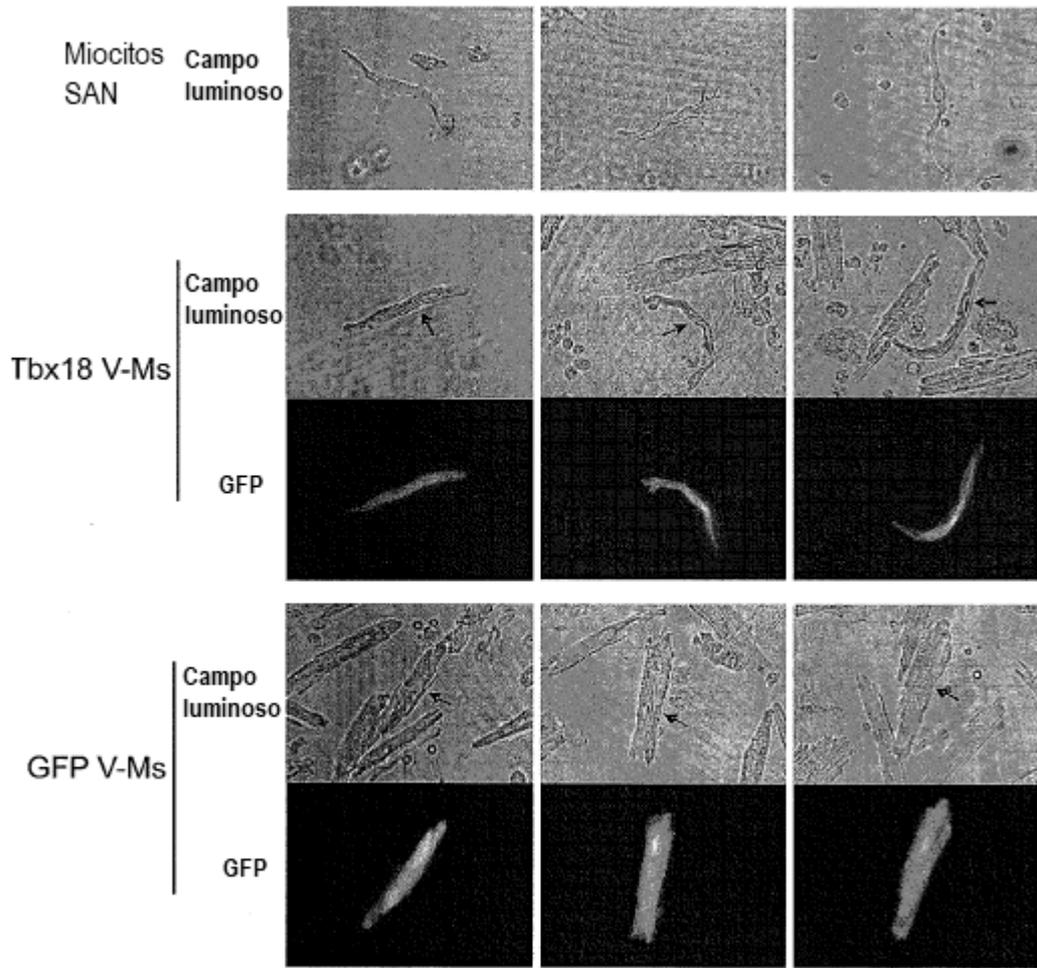
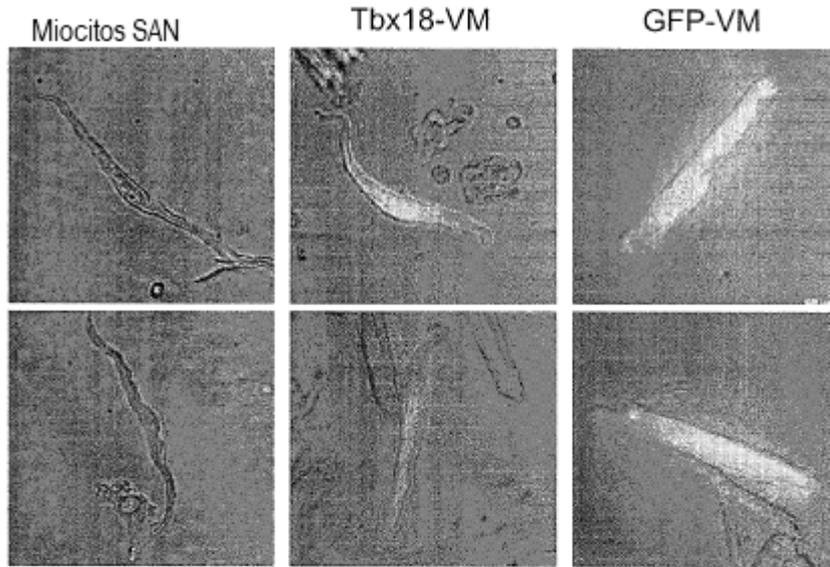


FIG. 9B

Miocitos SAN vivos aislados recientemente



Inmunotinción de miocitos fijados

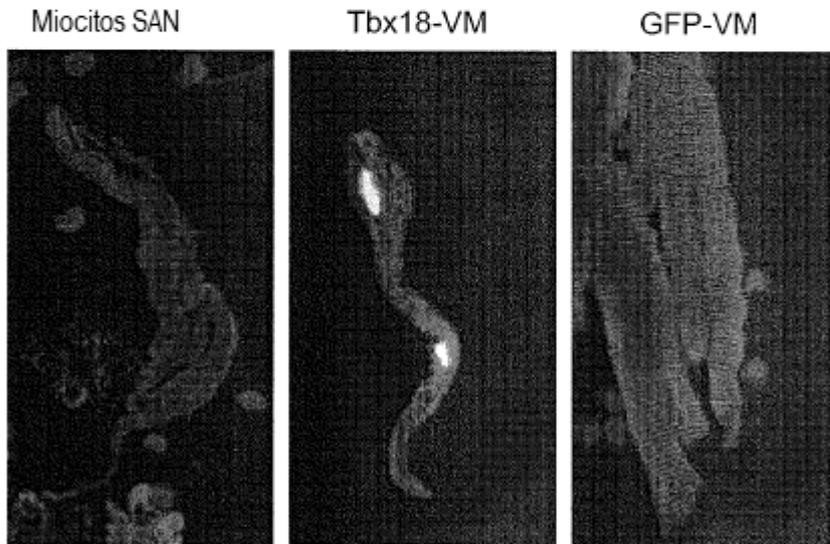


FIG. 9C

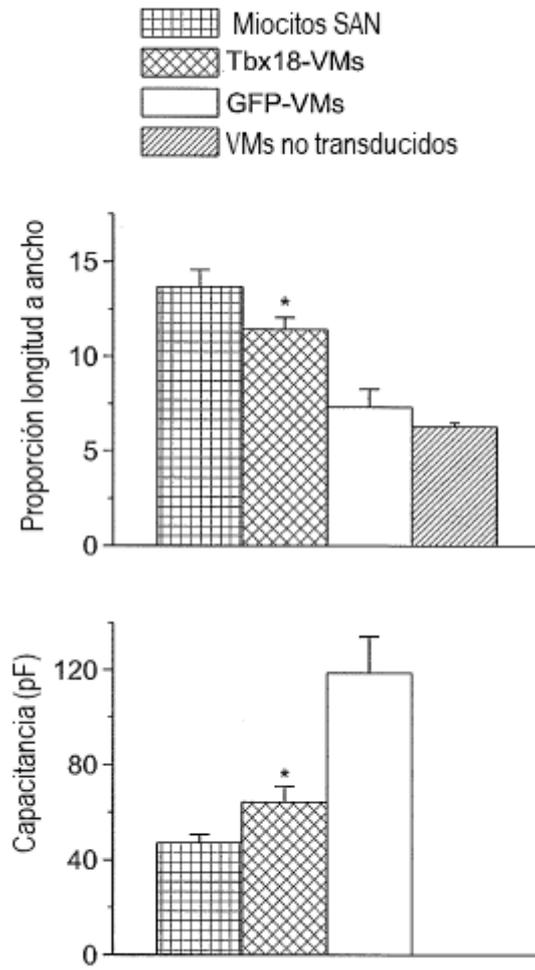


FIG. 9D

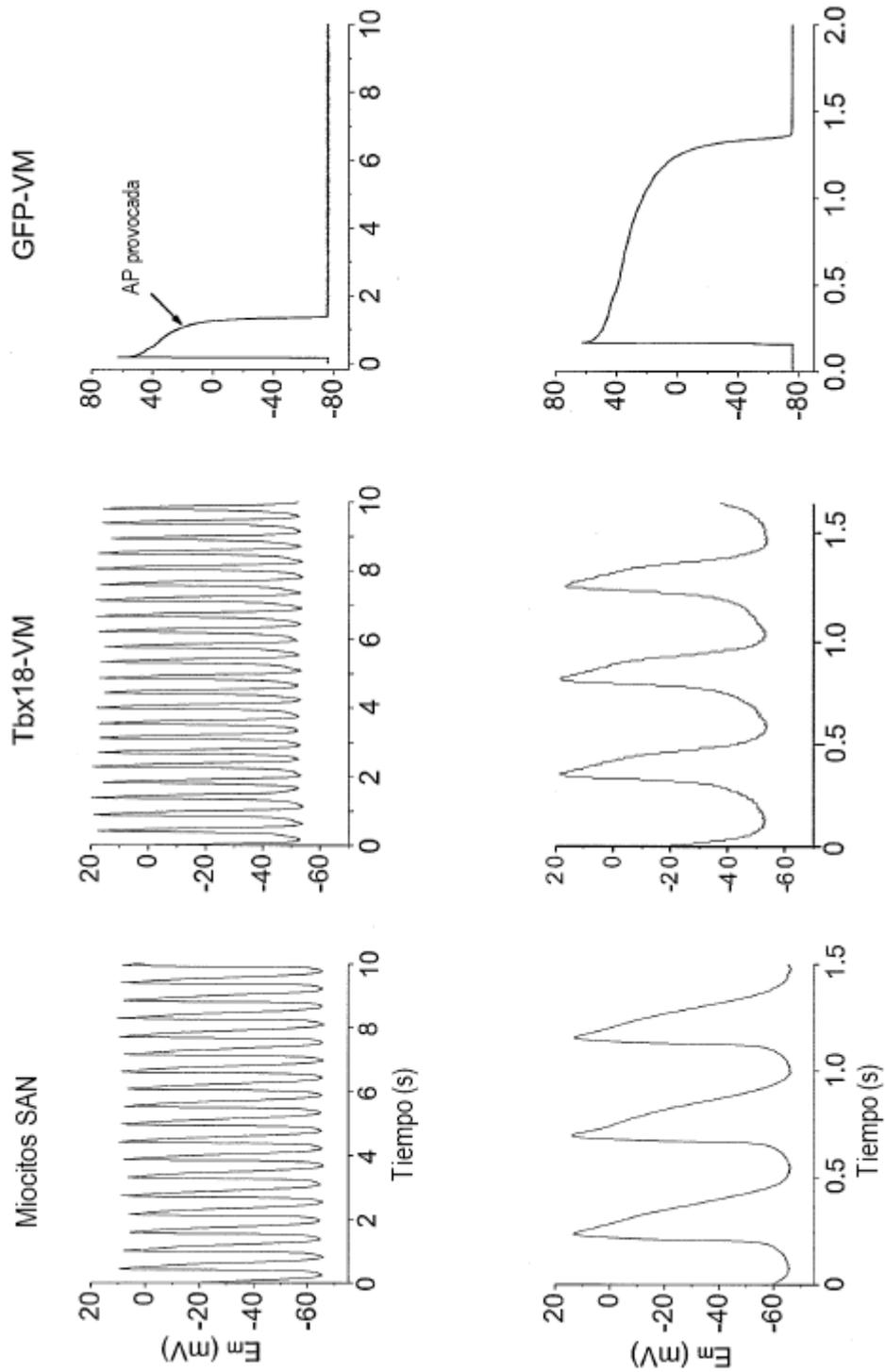


FIG. 9E

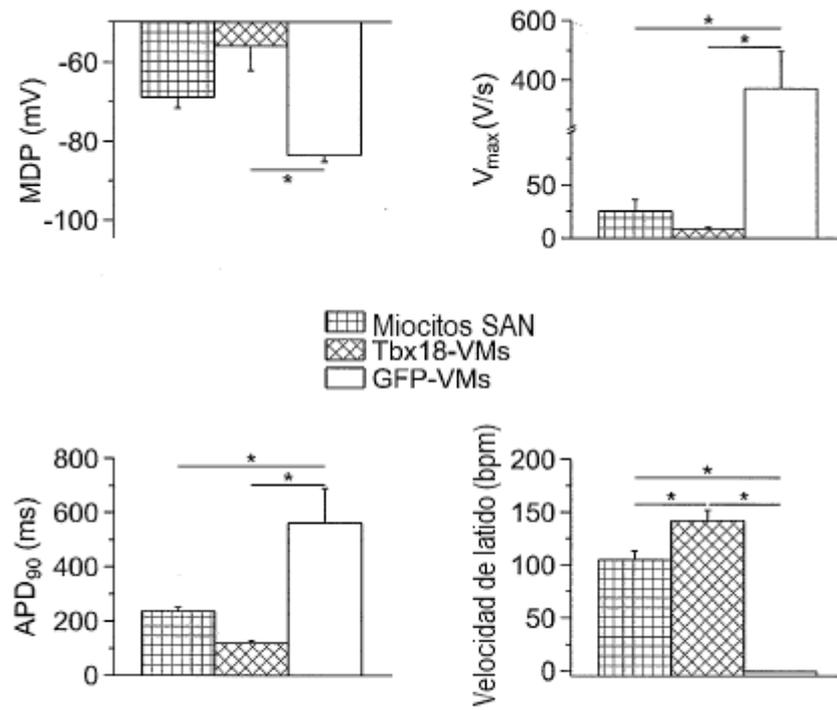


FIG. 9F

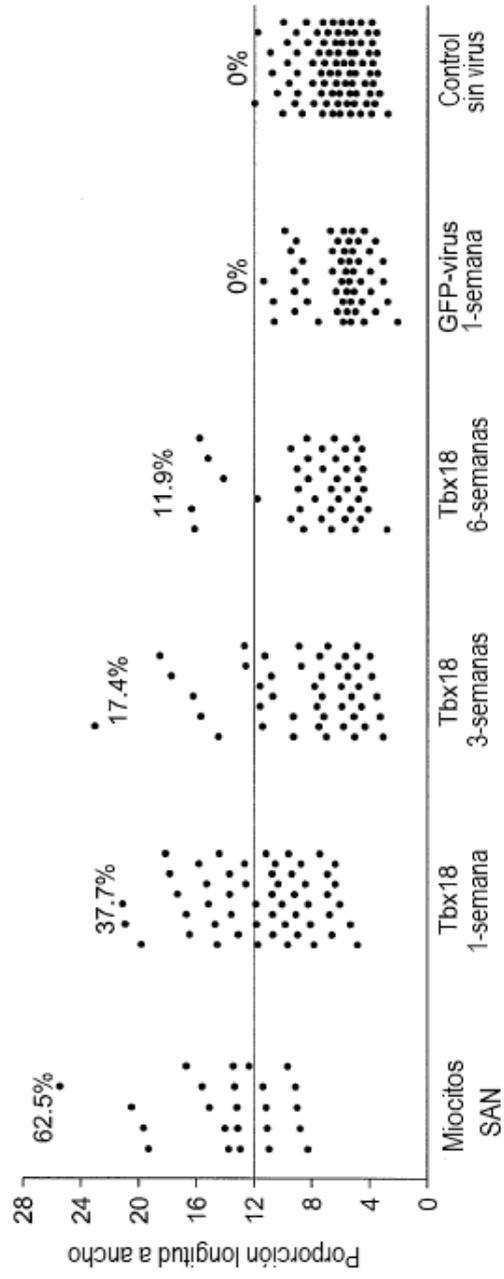


FIG. 9G

Marcadores específicos de células madre: matriz RT-PCR

Tbx18-NRVMs vs. GFP-NRVMs

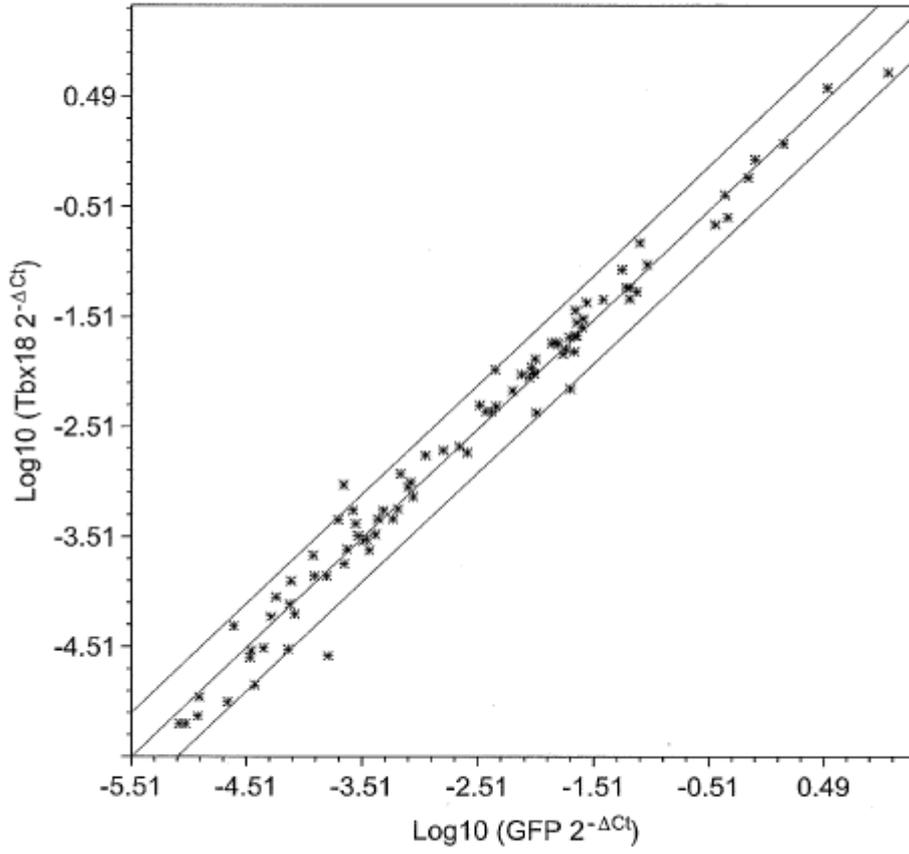


FIG. 10A

Marcadores específicos de células madre: matriz RT-PCR

célula iPS vs. Fibs parental

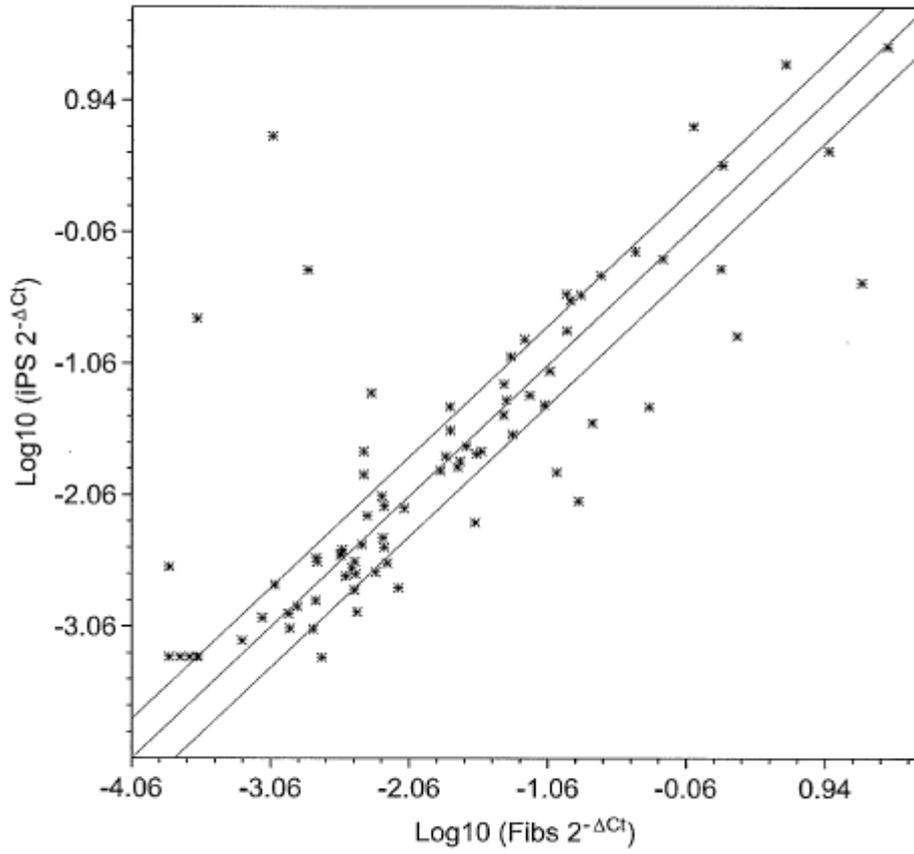


FIG. 10B

Marcadores específicos de células madre: matriz RT-PCR

Tbx18-NRCMs vs. GFP-NRCMs

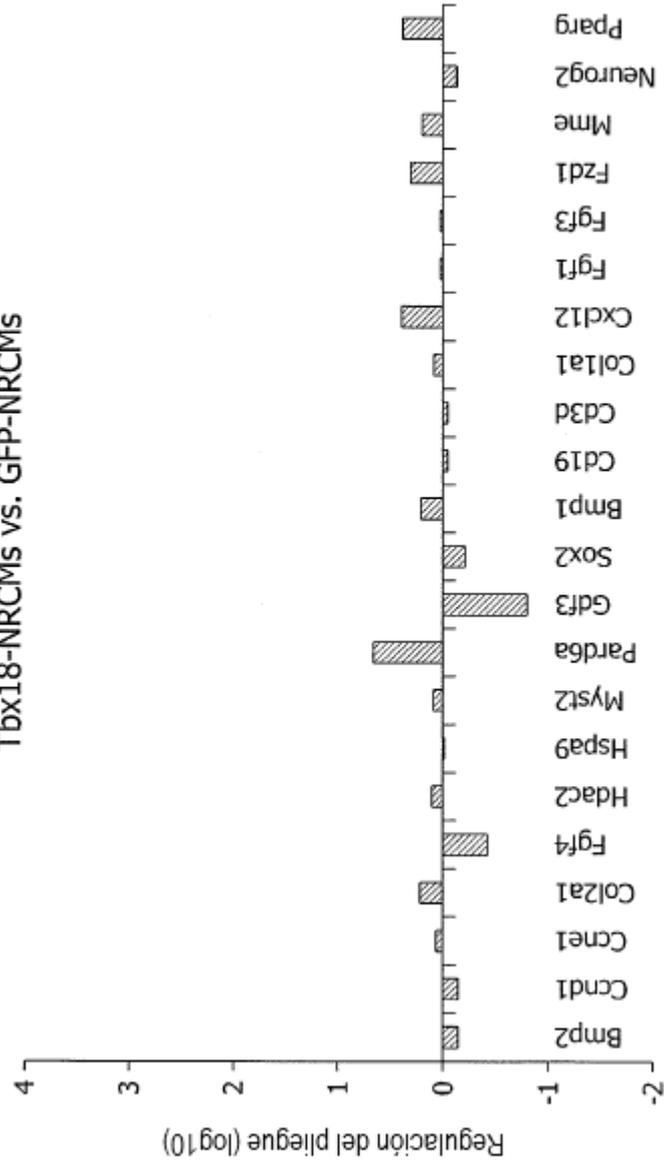


FIG. 10C

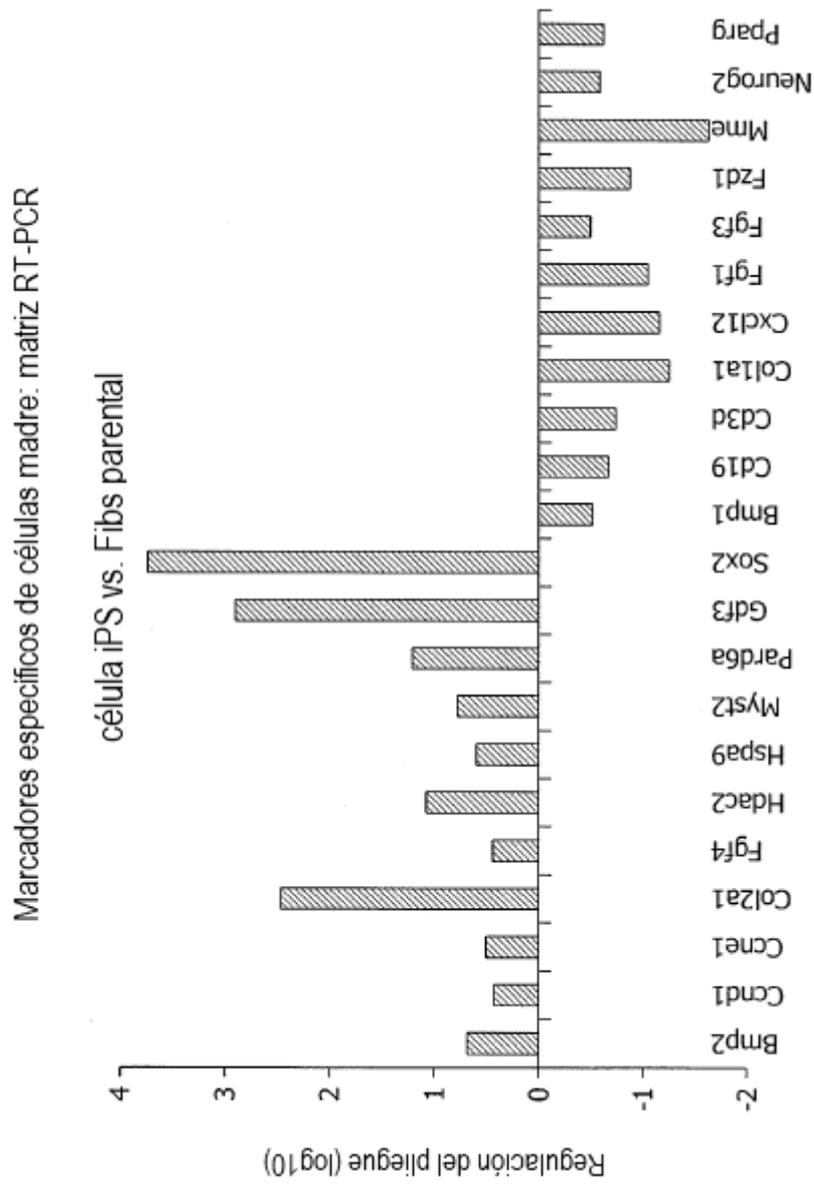


FIG. 10D

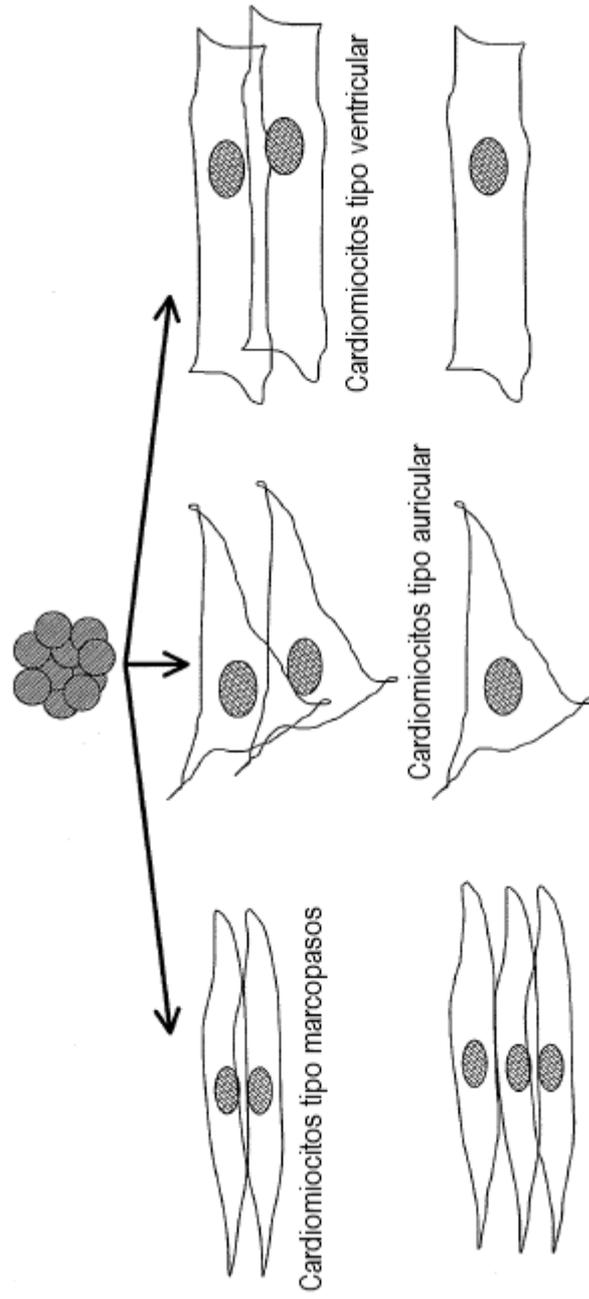


FIG. 11A

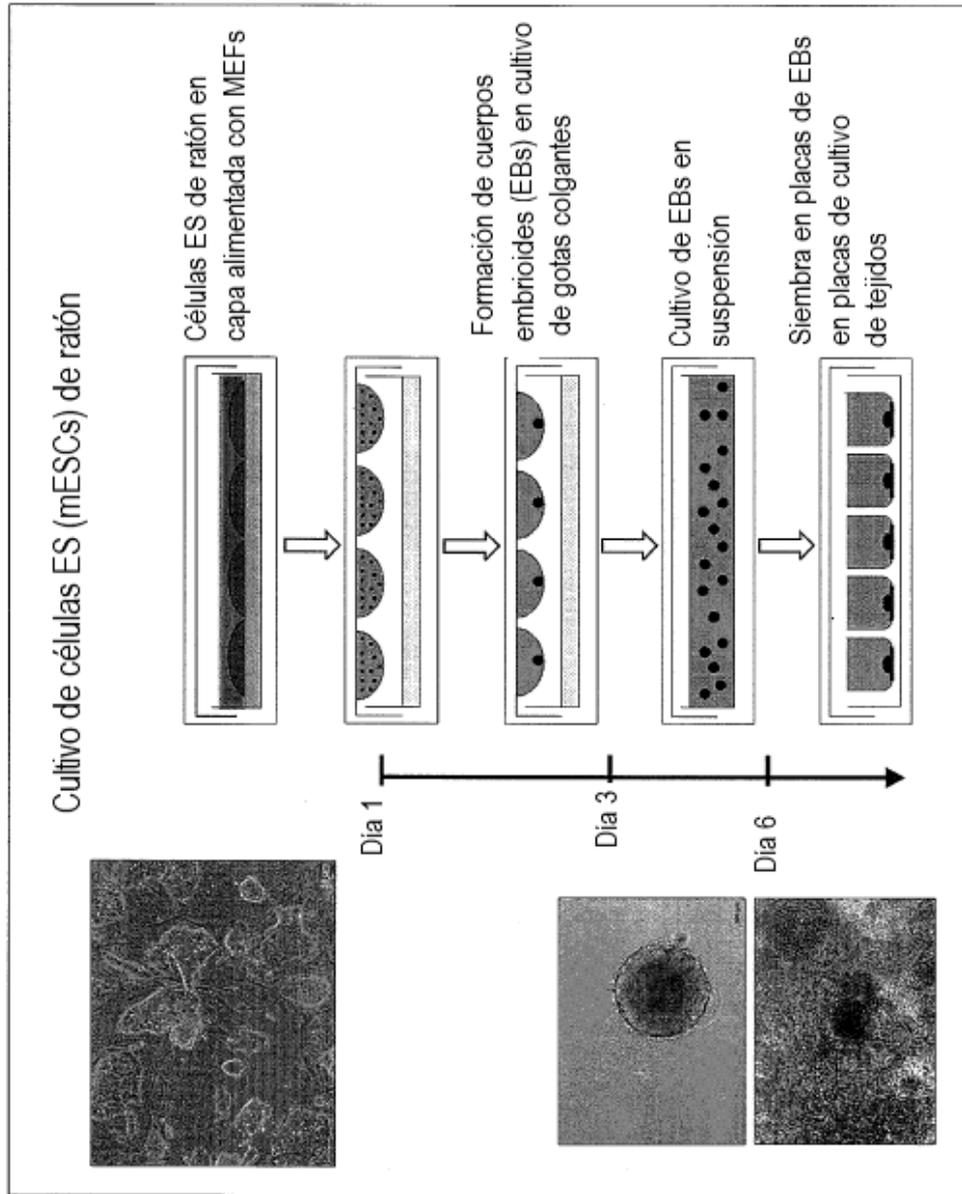


FIG. 11B

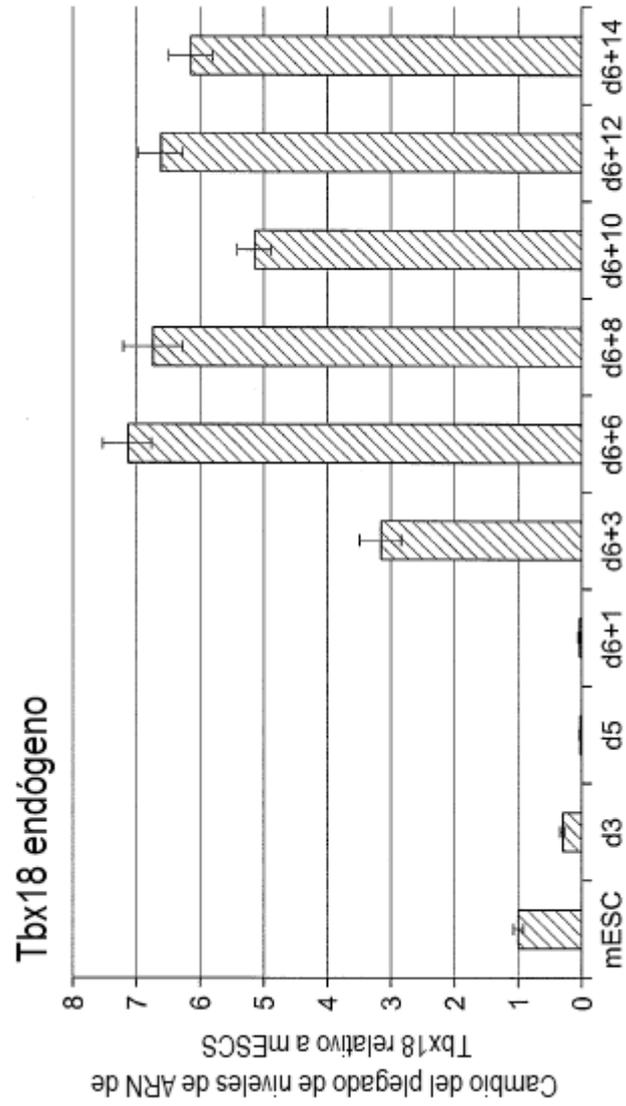


FIG. 12A

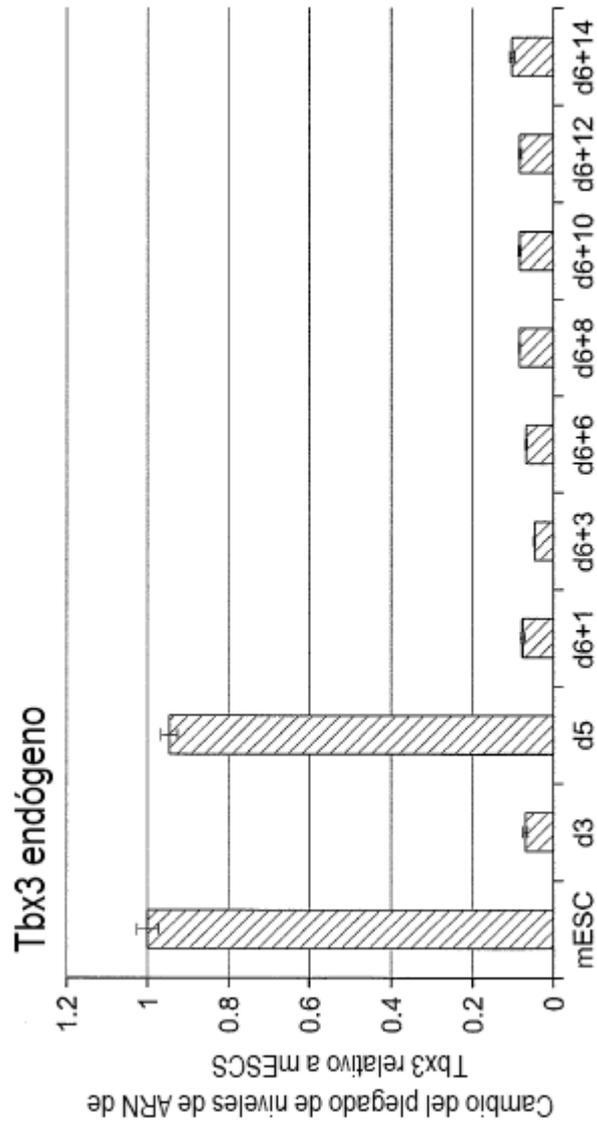


FIG. 12B

FIG. 13A

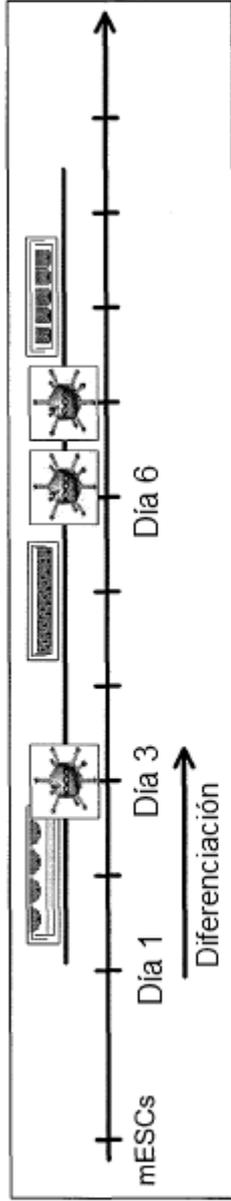
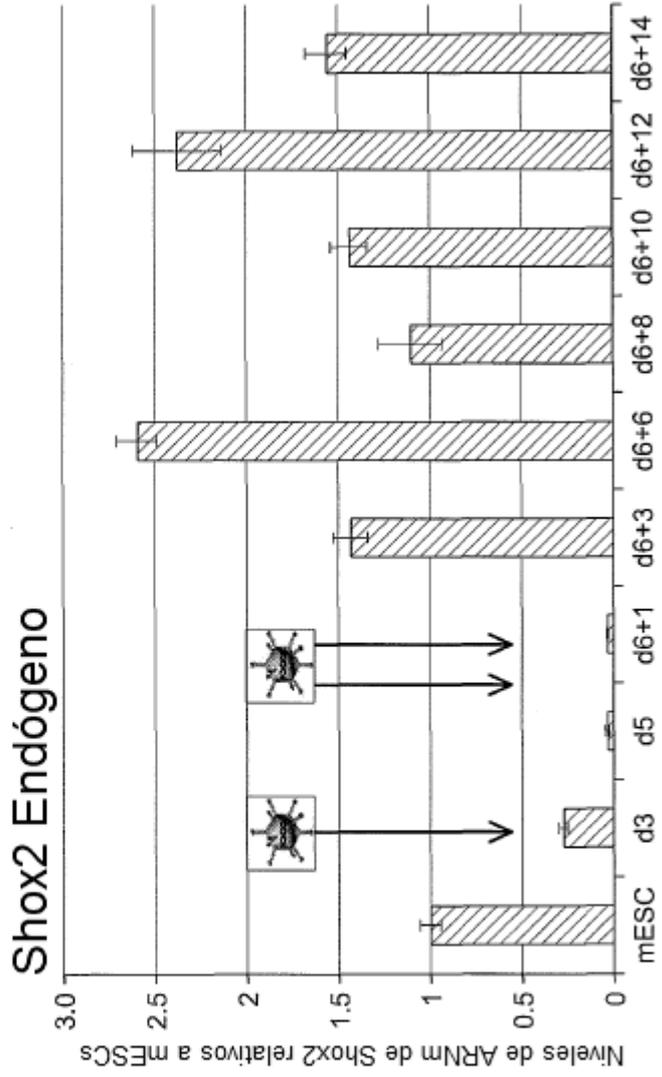


FIG. 13B



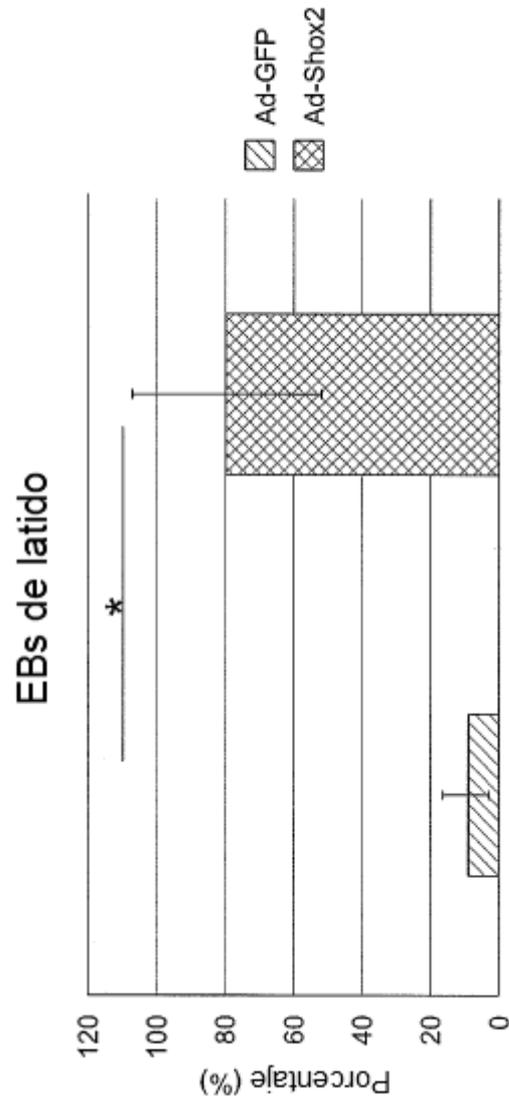


FIG. 14A

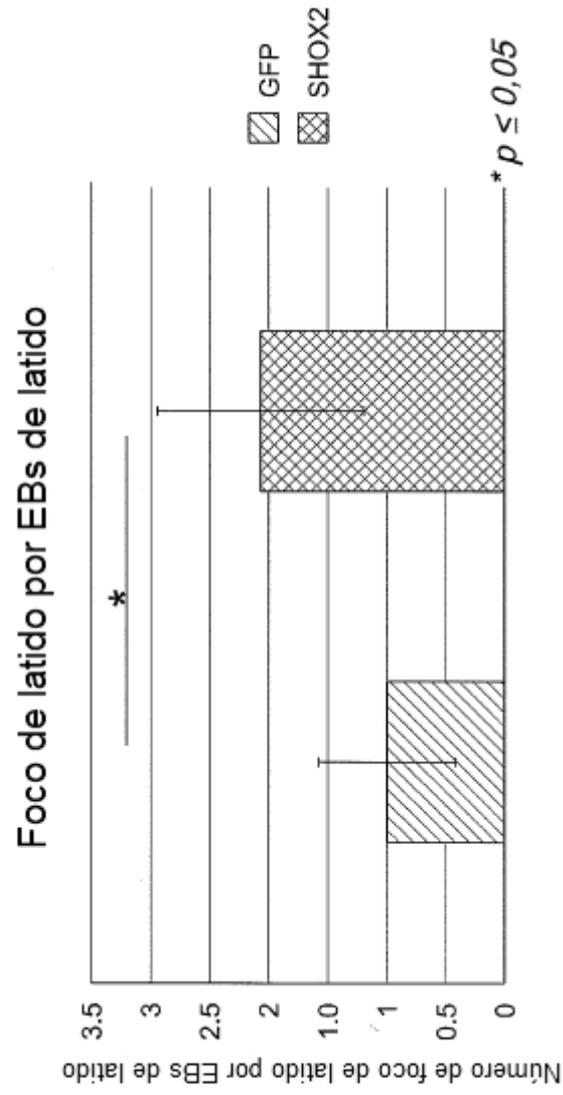
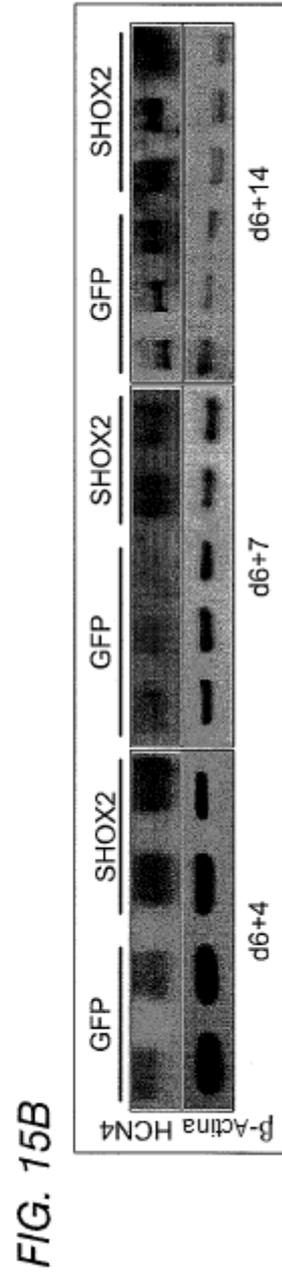
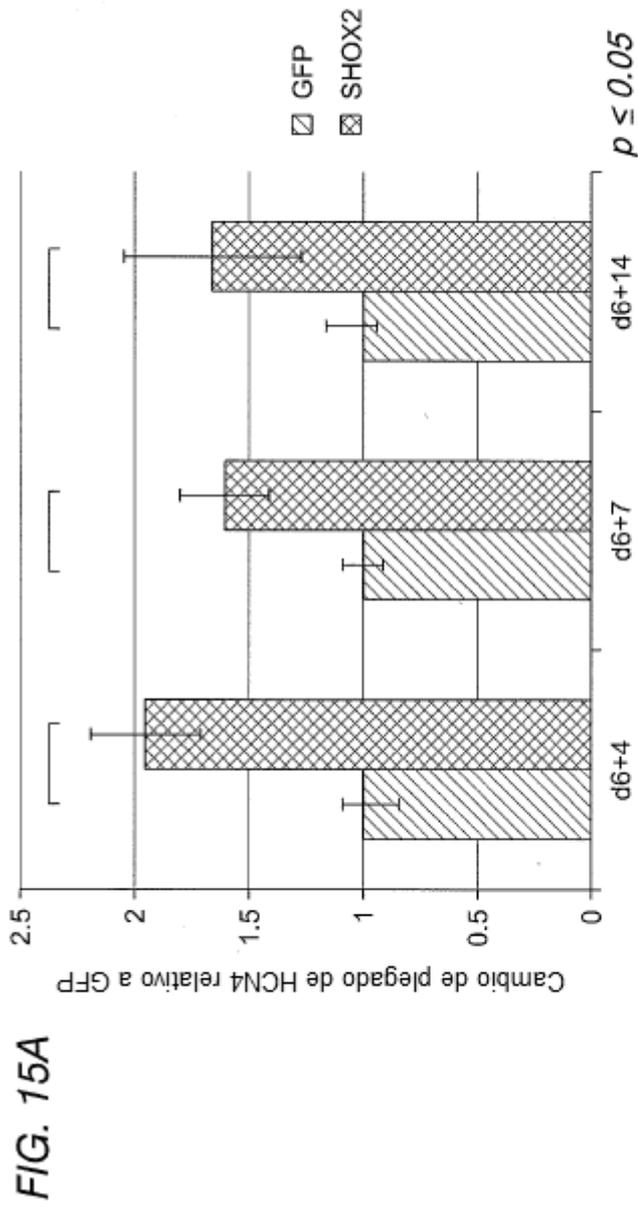


FIG. 14B



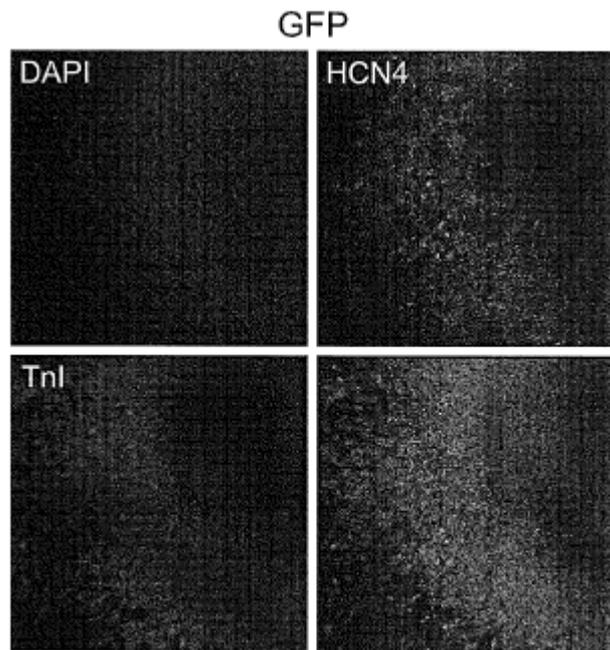


FIG. 16A

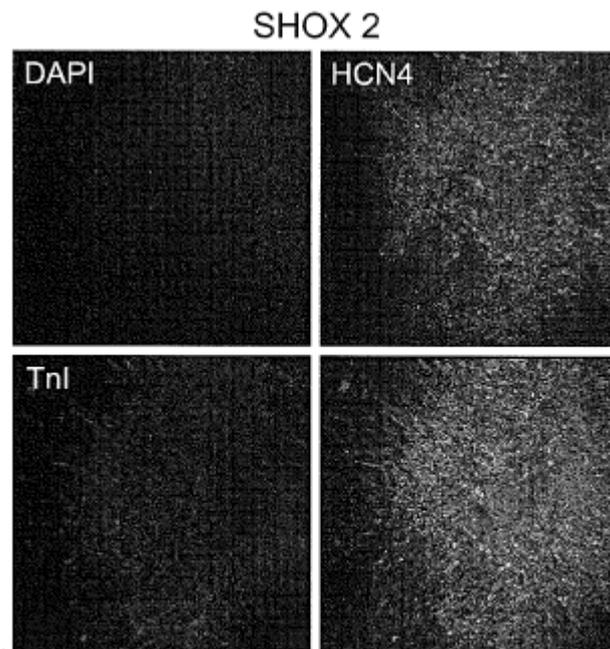


FIG. 16B

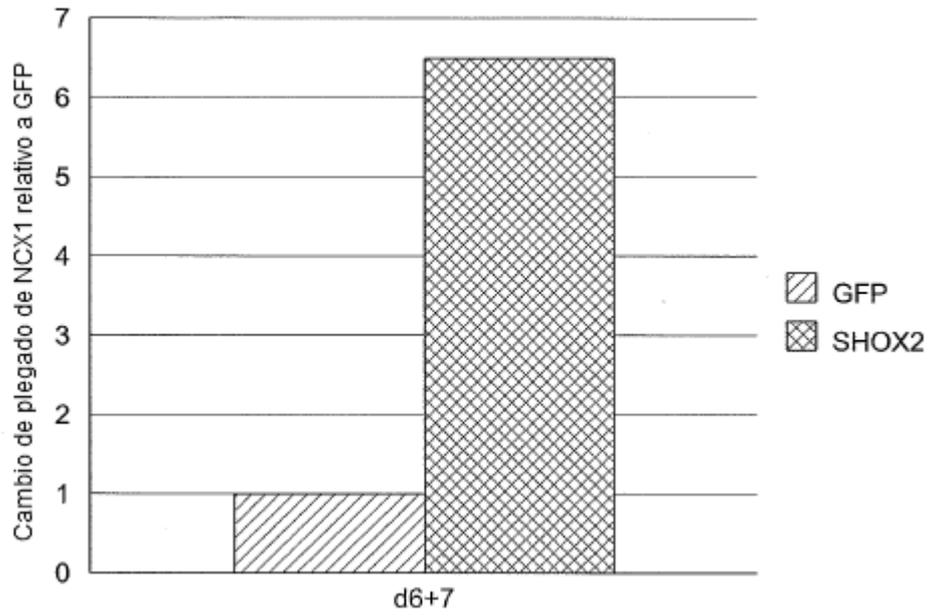


FIG. 17A

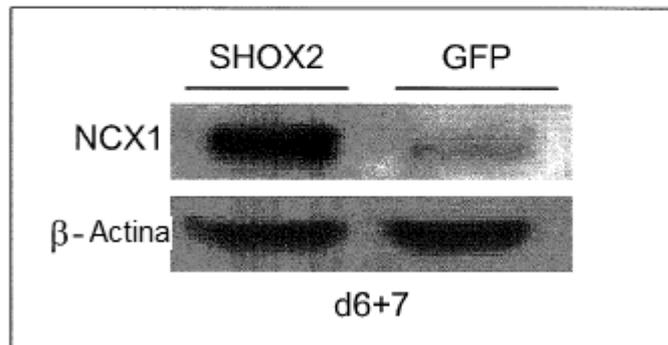


FIG. 17B

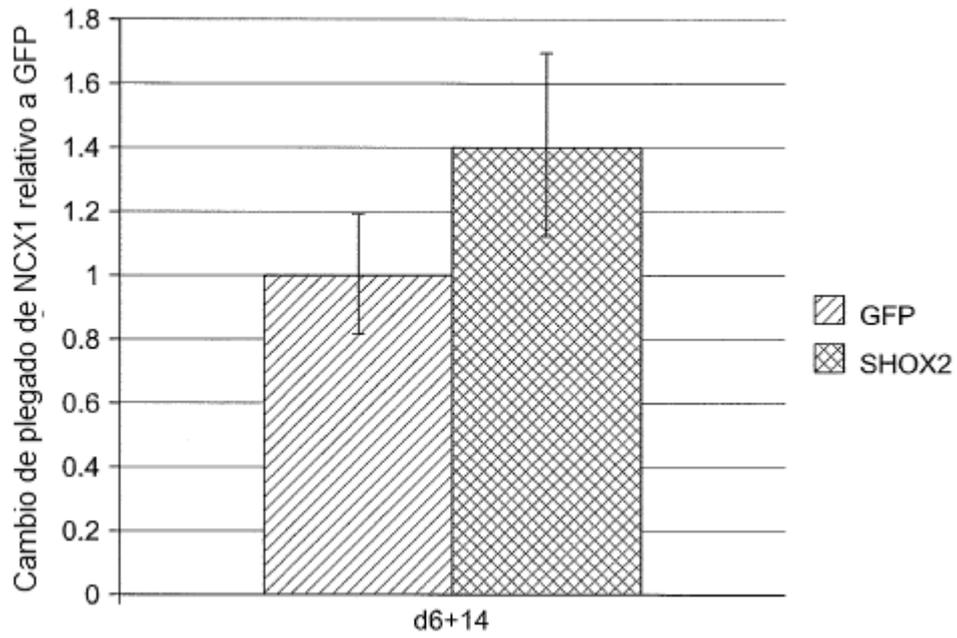


FIG. 18A

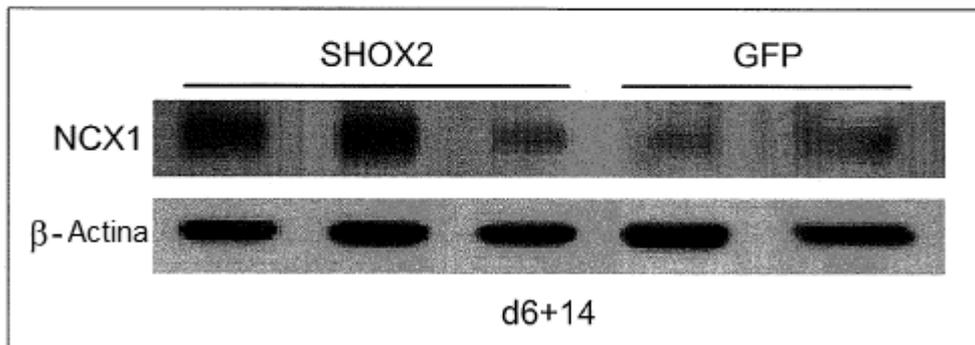


FIG. 18B

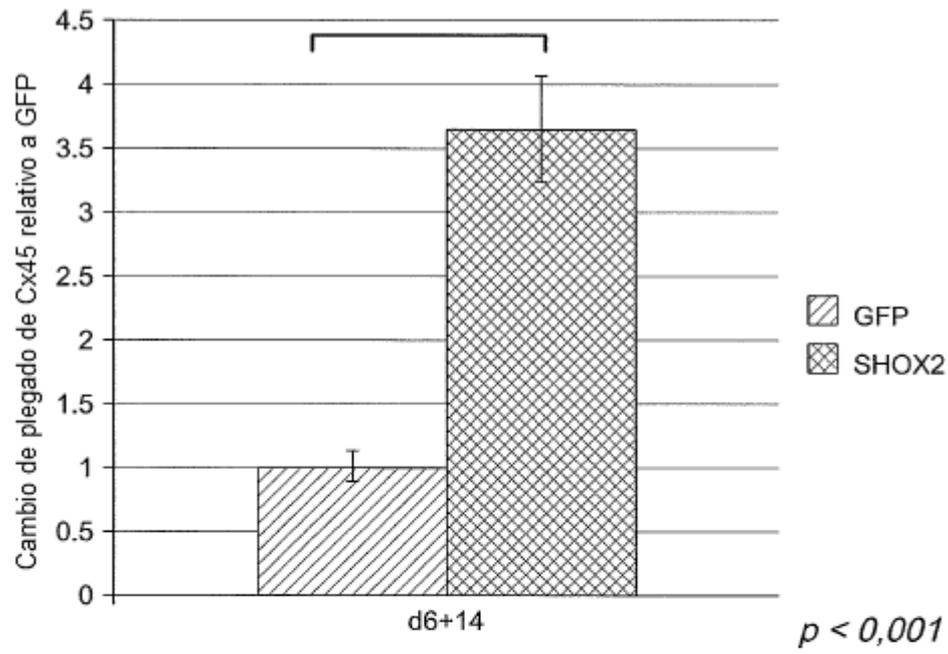


FIG. 19A

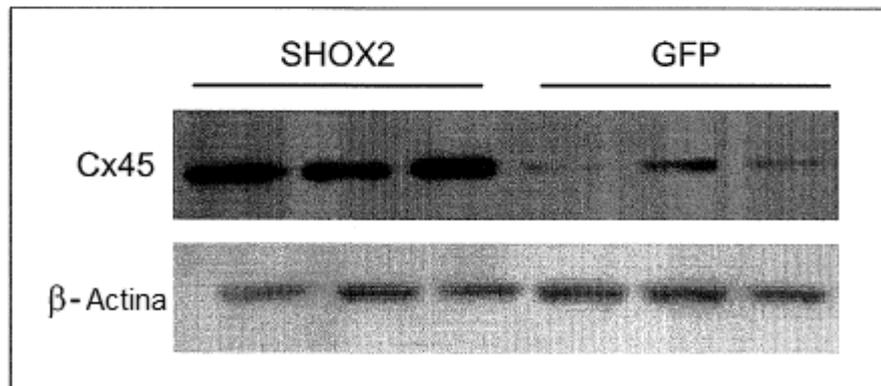


FIG. 19B

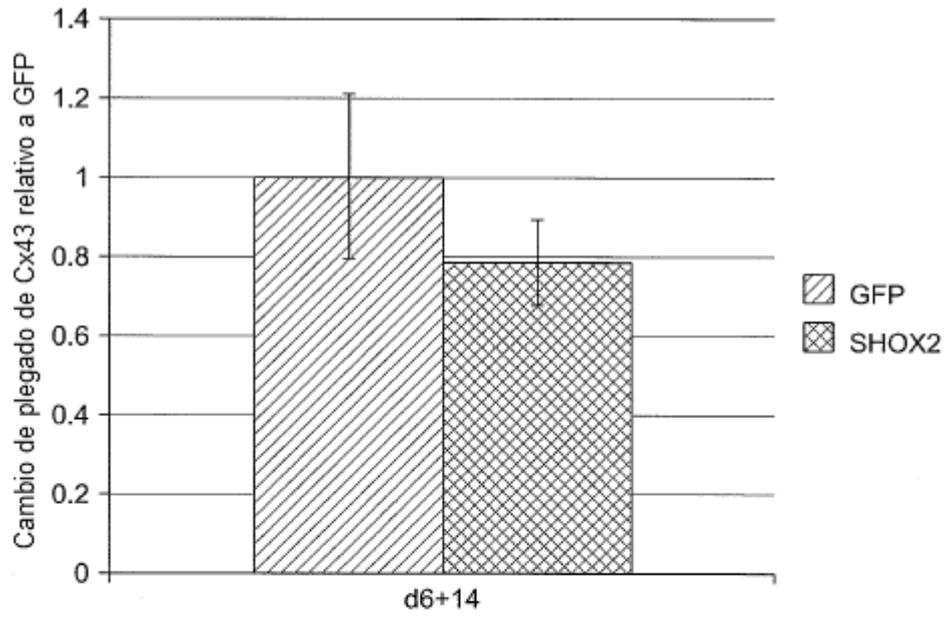


FIG. 20A

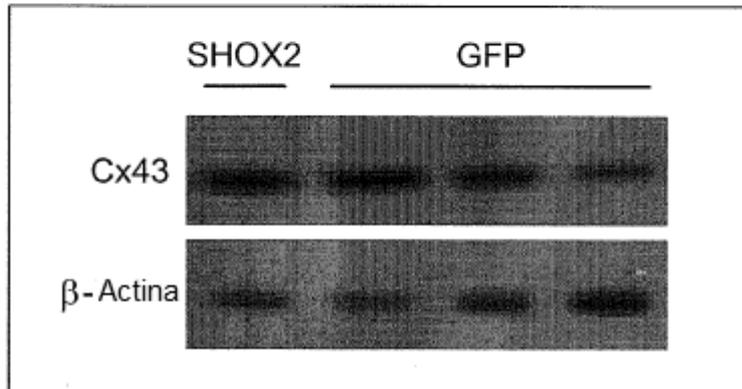


FIG. 20B

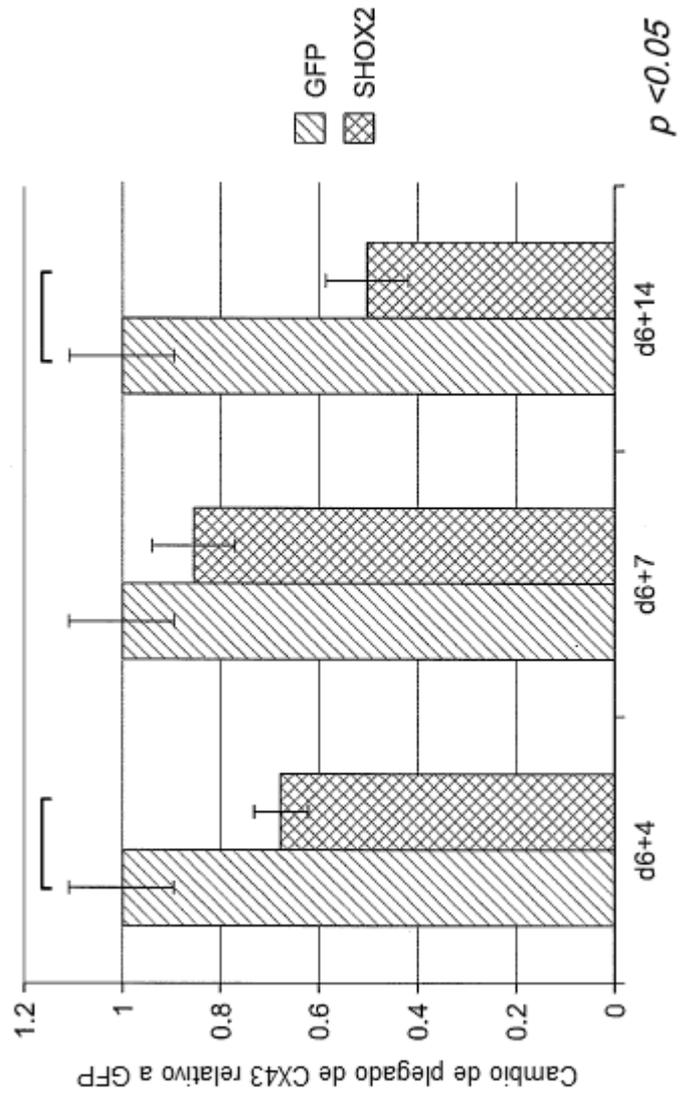


FIG. 21A

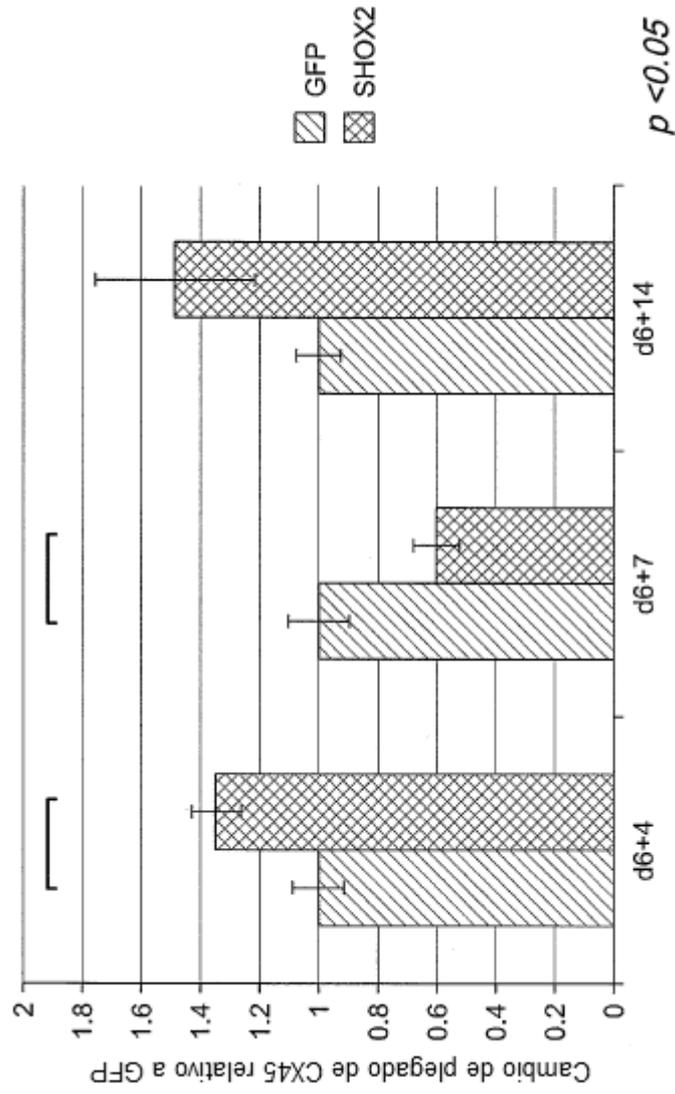


FIG. 21B

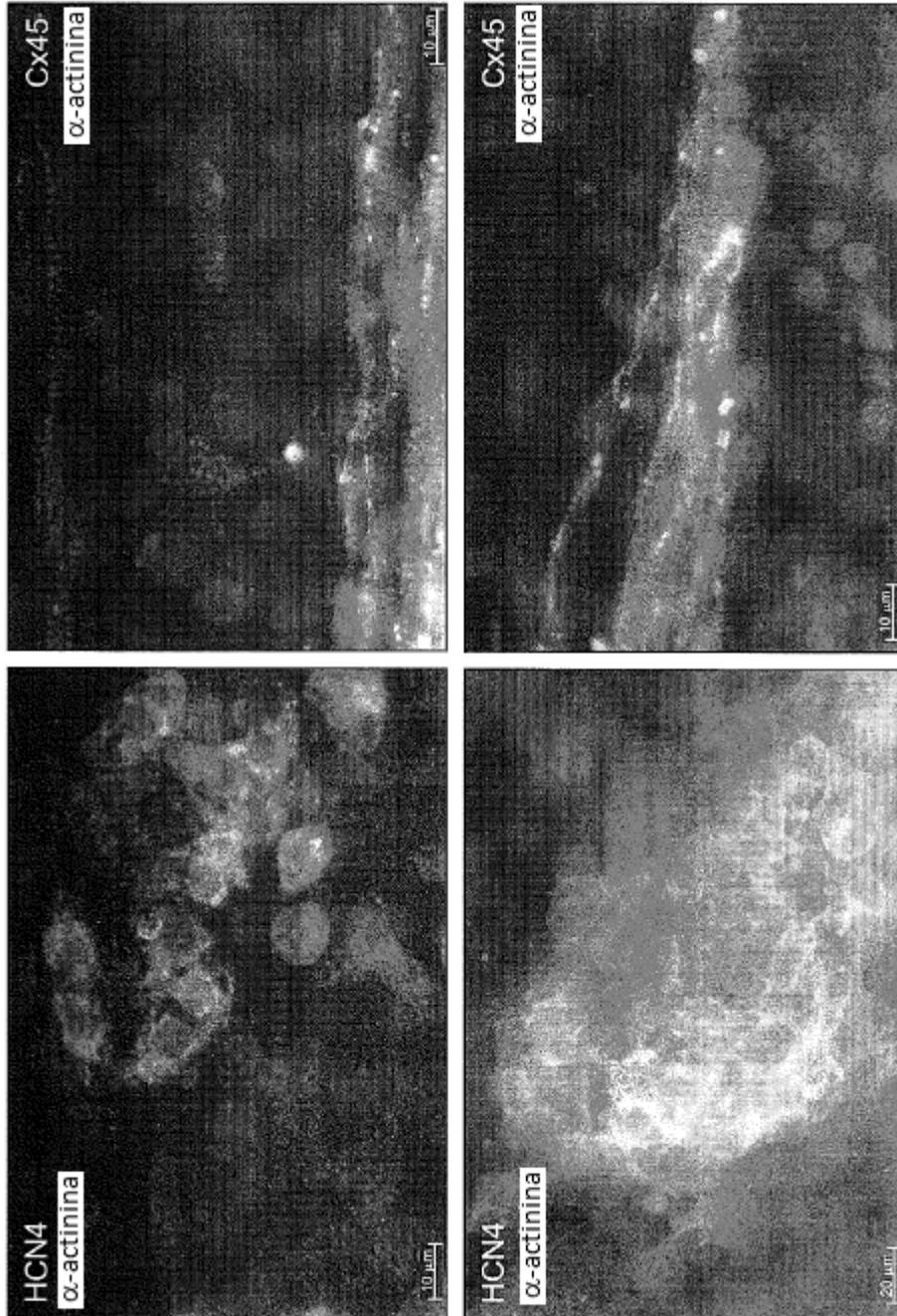


FIG. 22

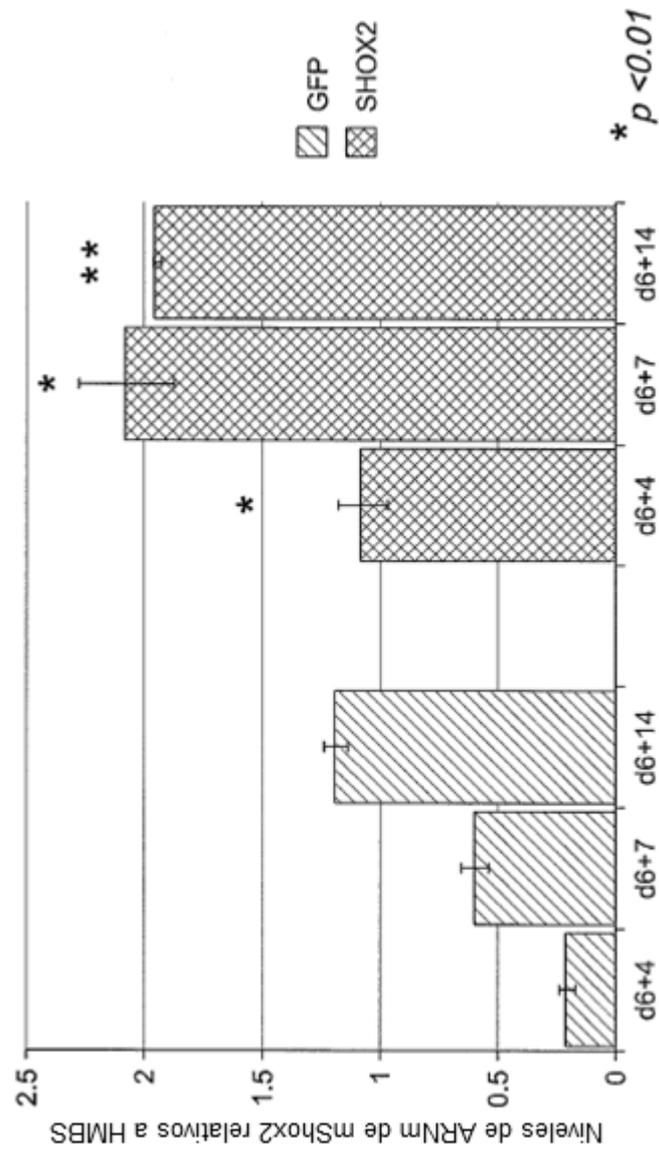


FIG. 23A

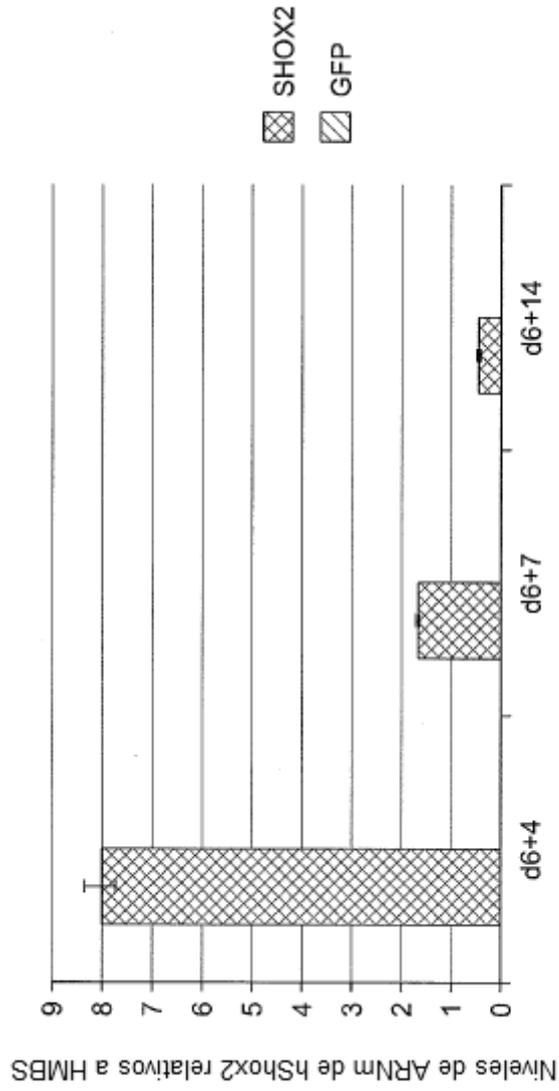


FIG. 23B

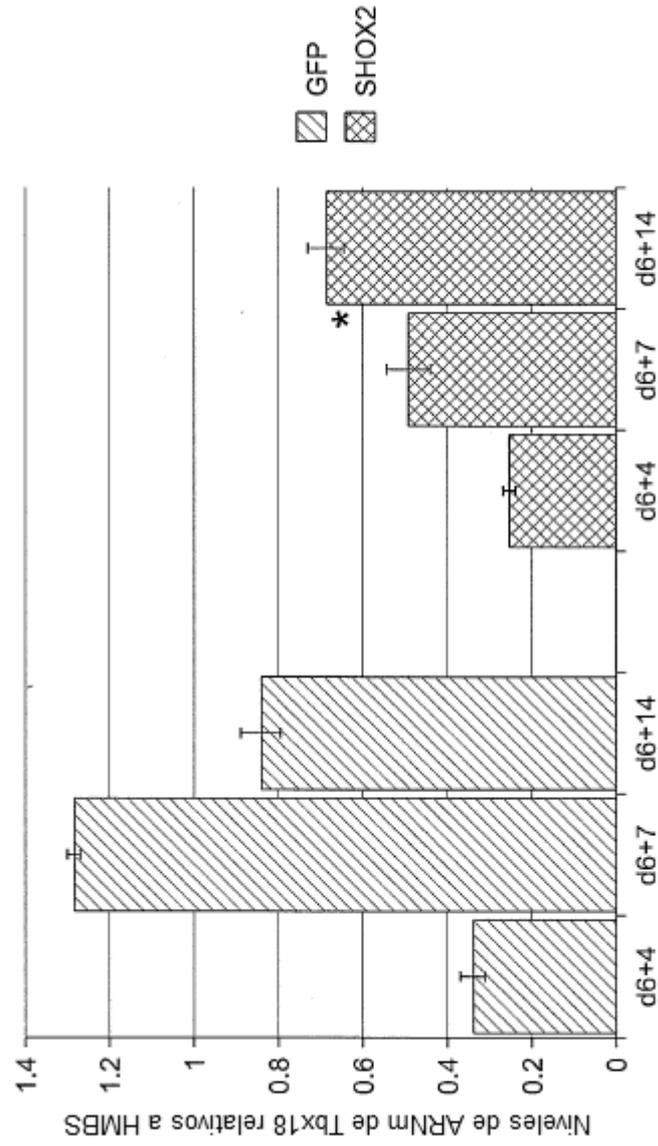


FIG. 24A

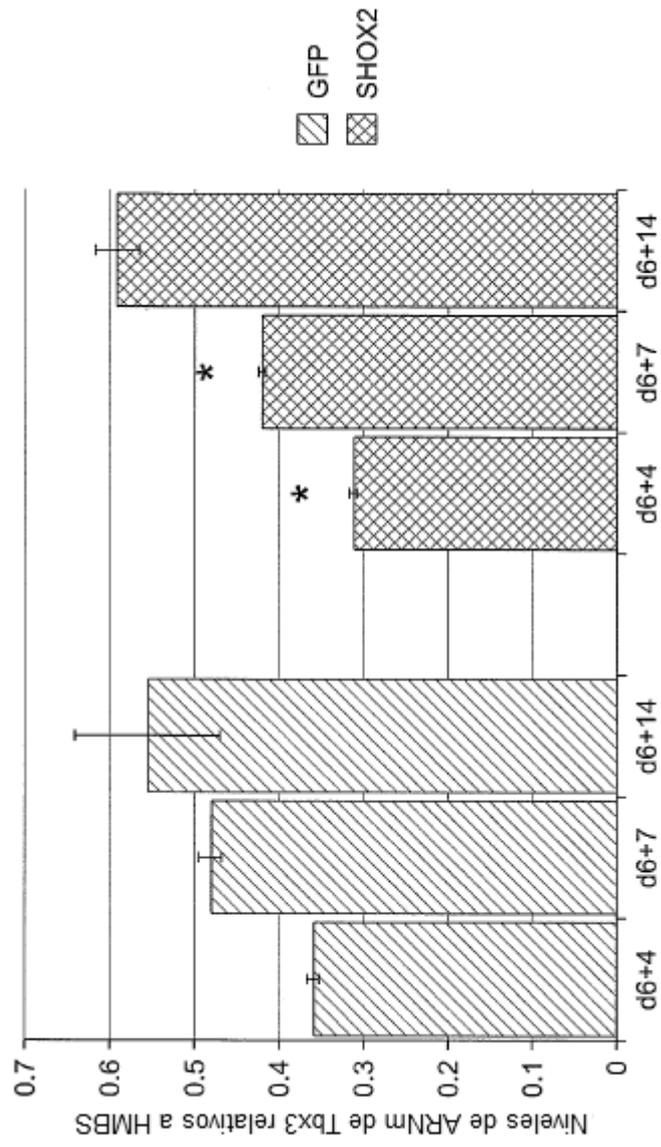


FIG. 24B

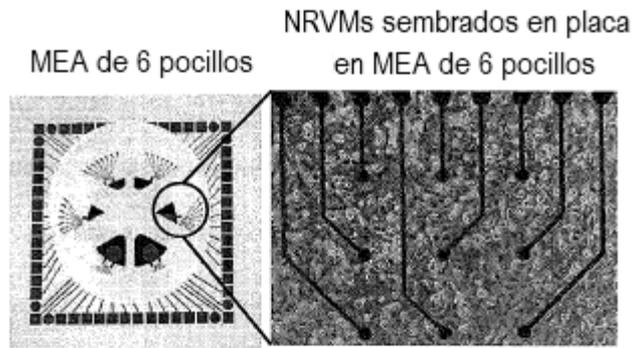


FIG. 25A

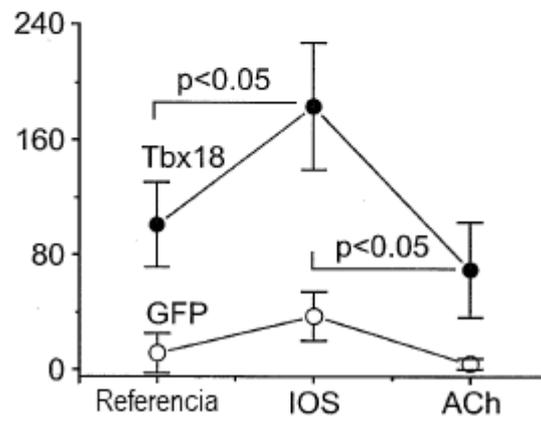


FIG. 25B

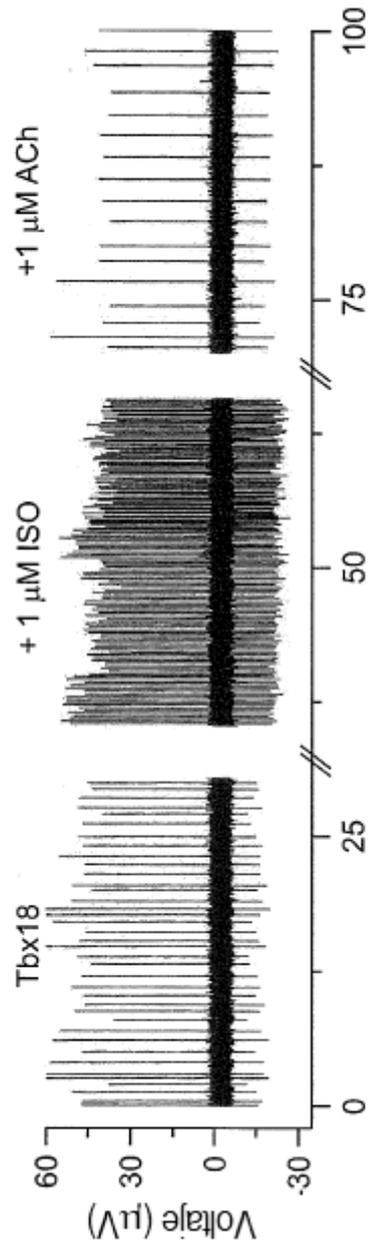


FIG. 25C

NRVMs transducidos con Tbx18-IRES-GFP

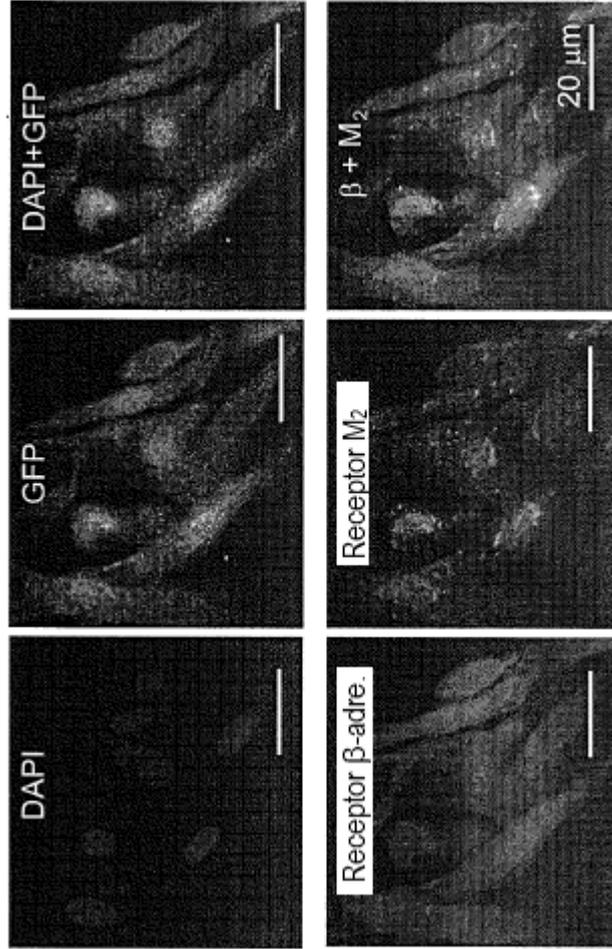


FIG. 25D

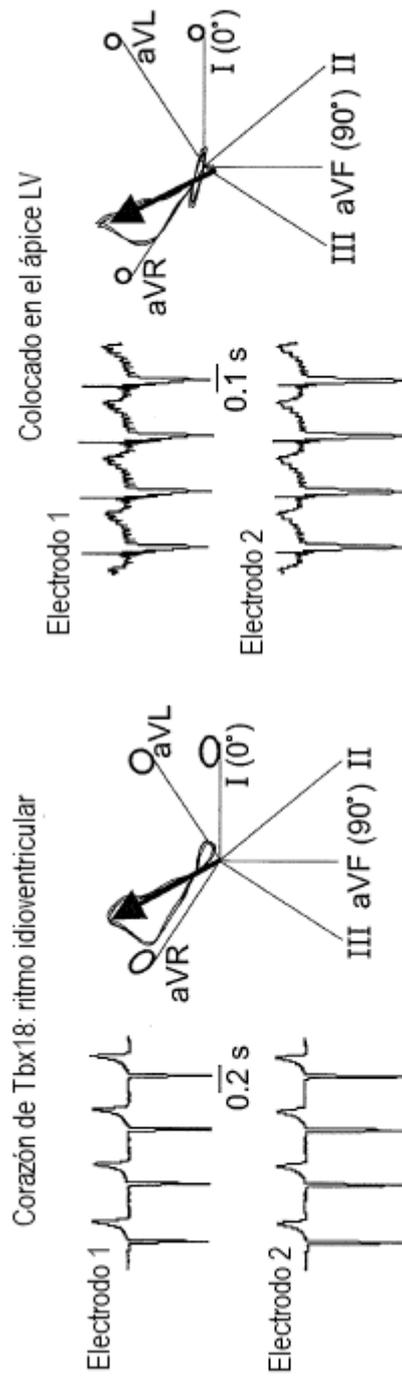


FIG. 25E

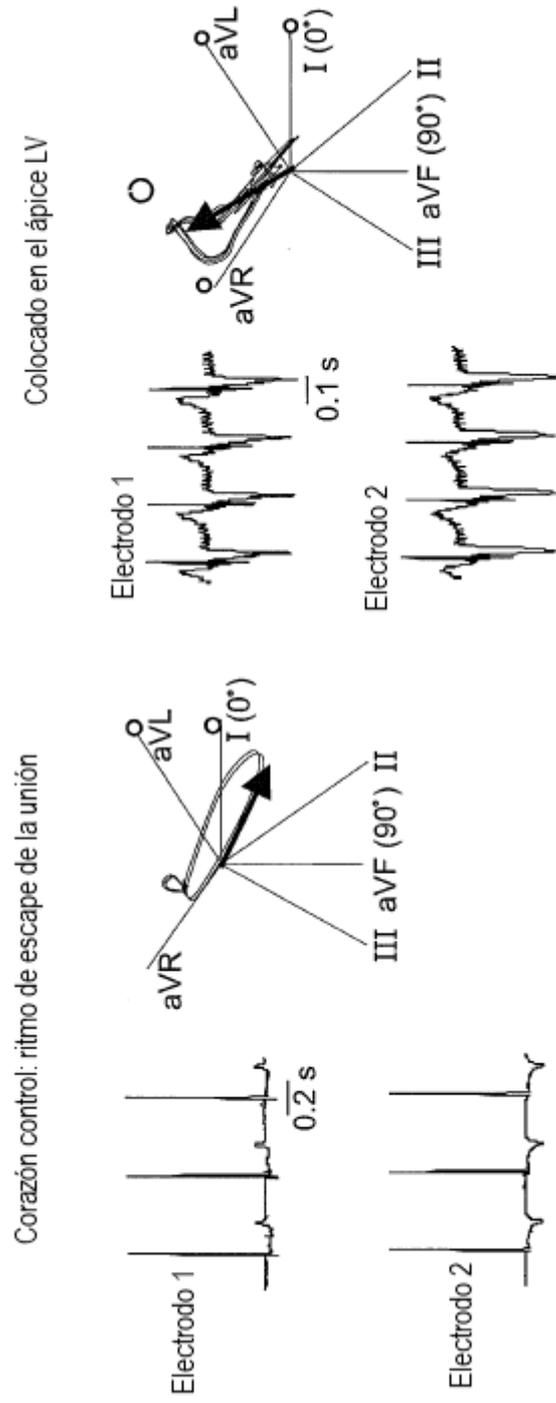


FIG. 25F

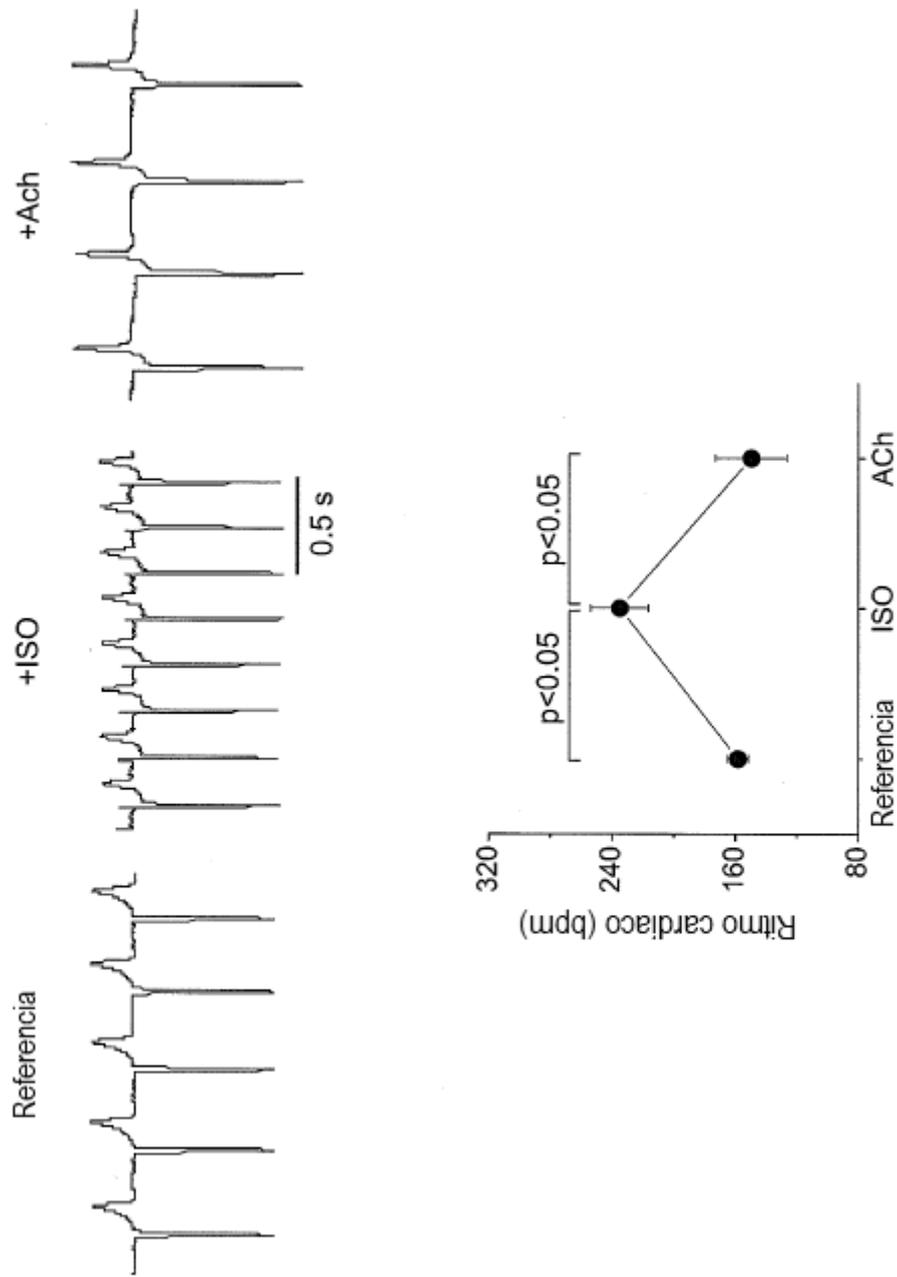


FIG. 25G

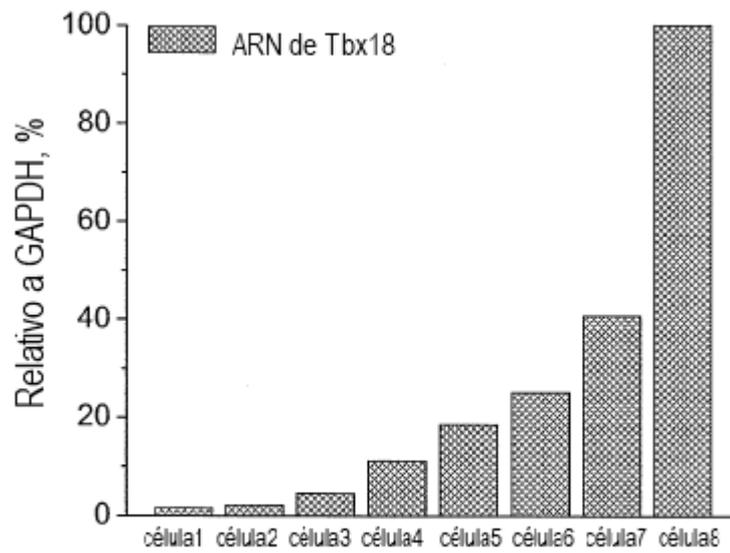
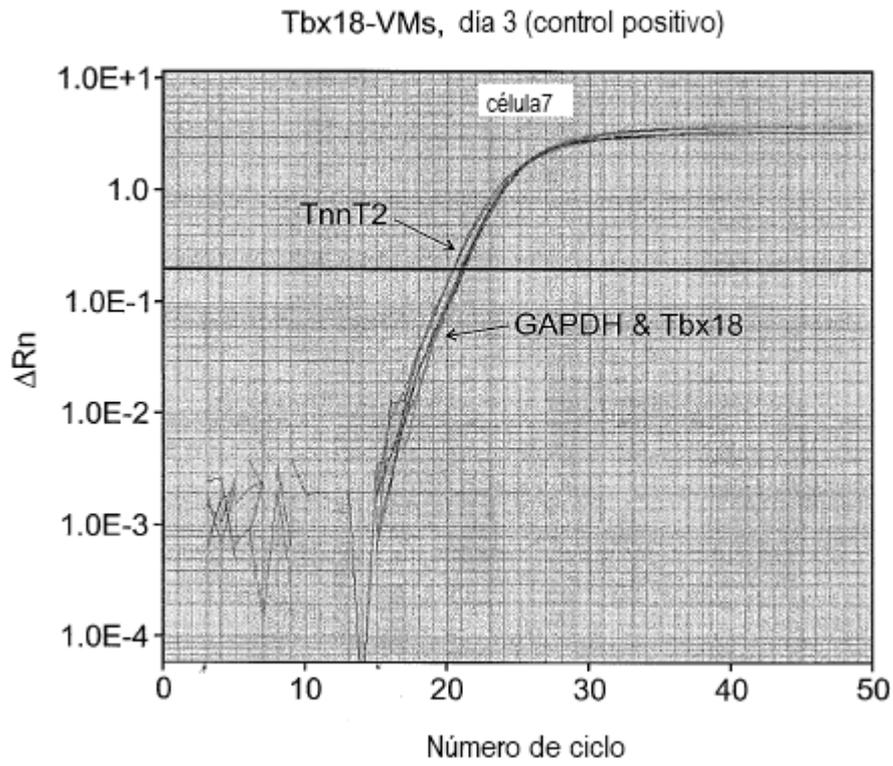


FIG. 26A

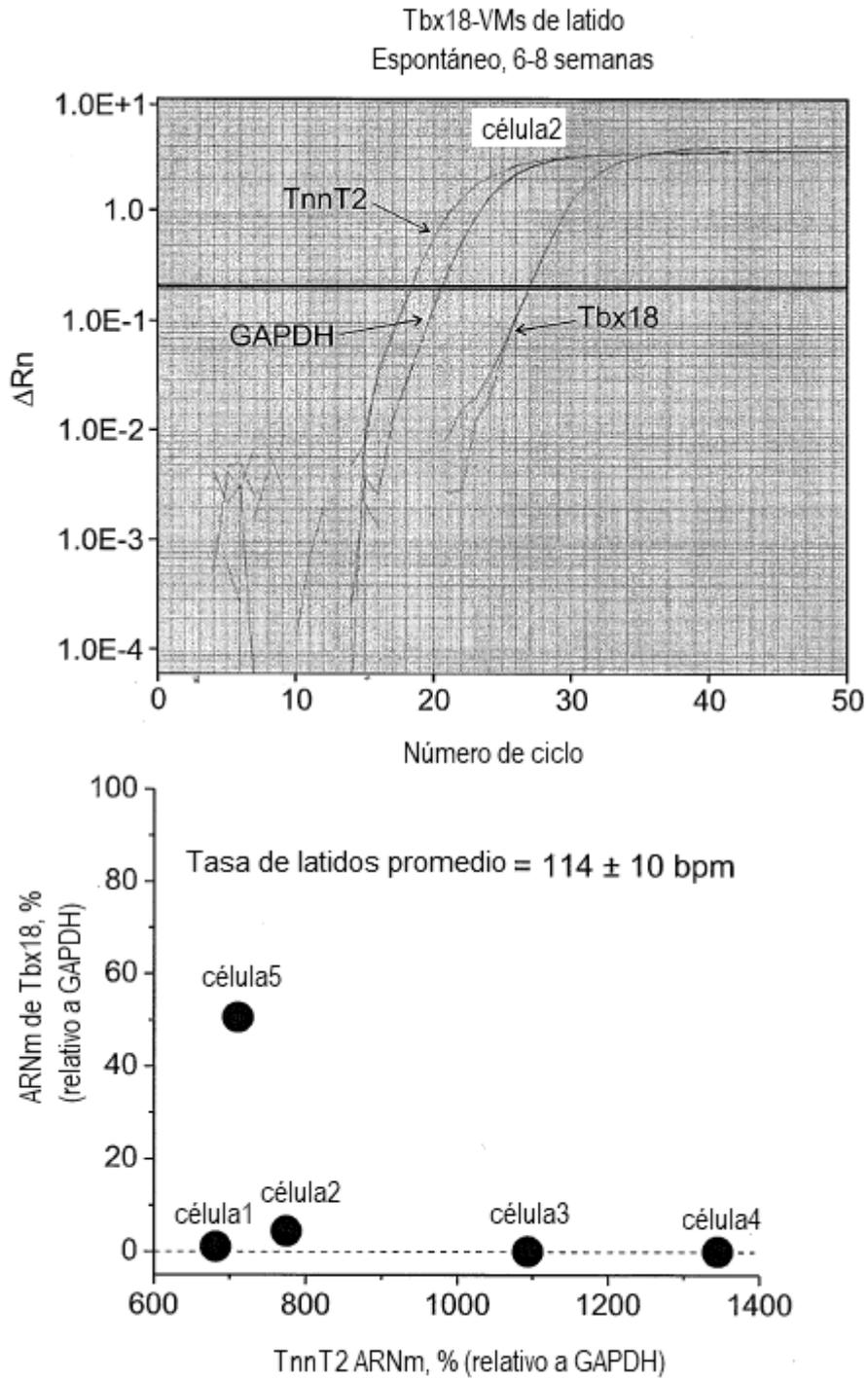


FIG. 26B

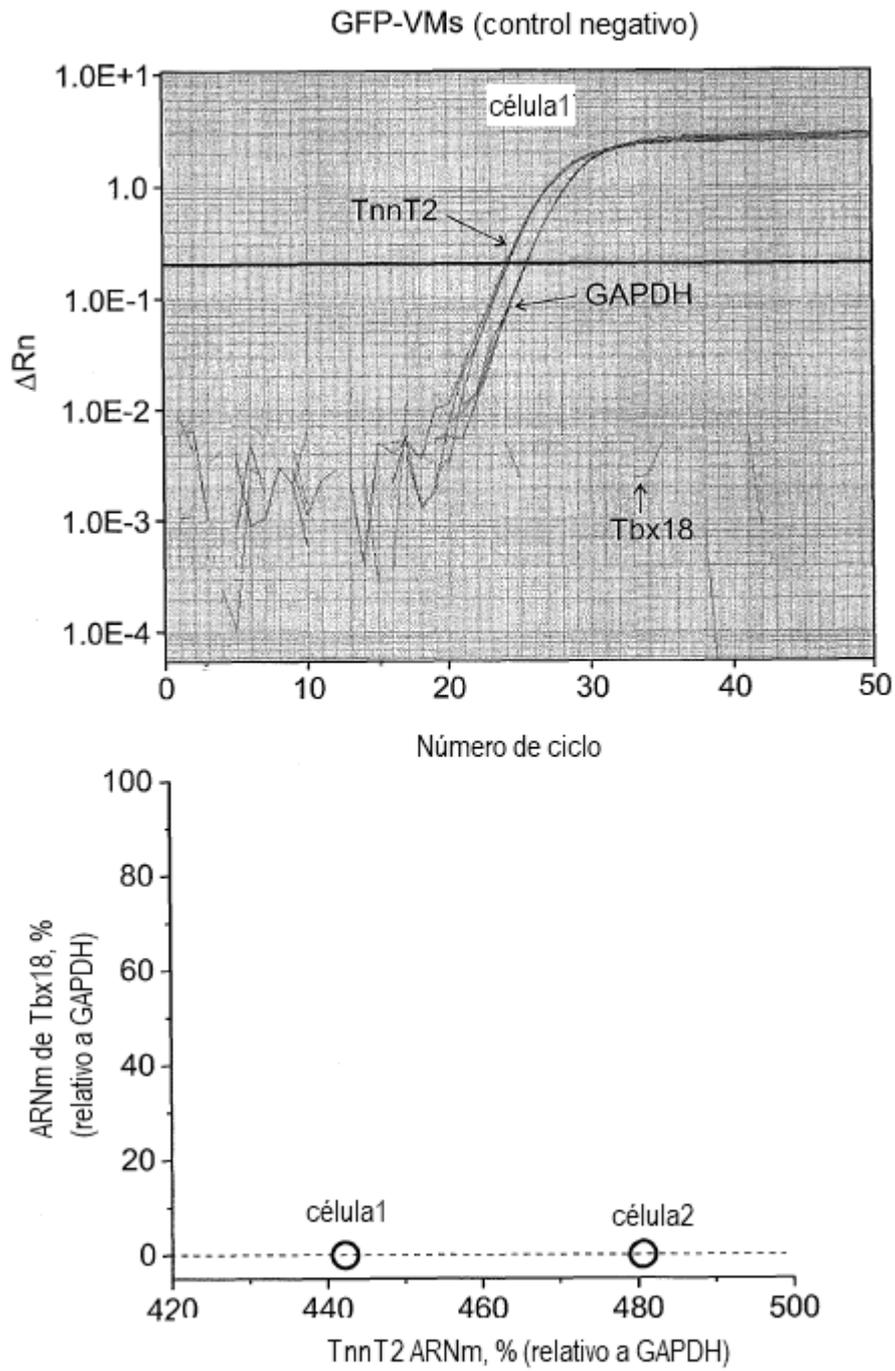


FIG. 26C

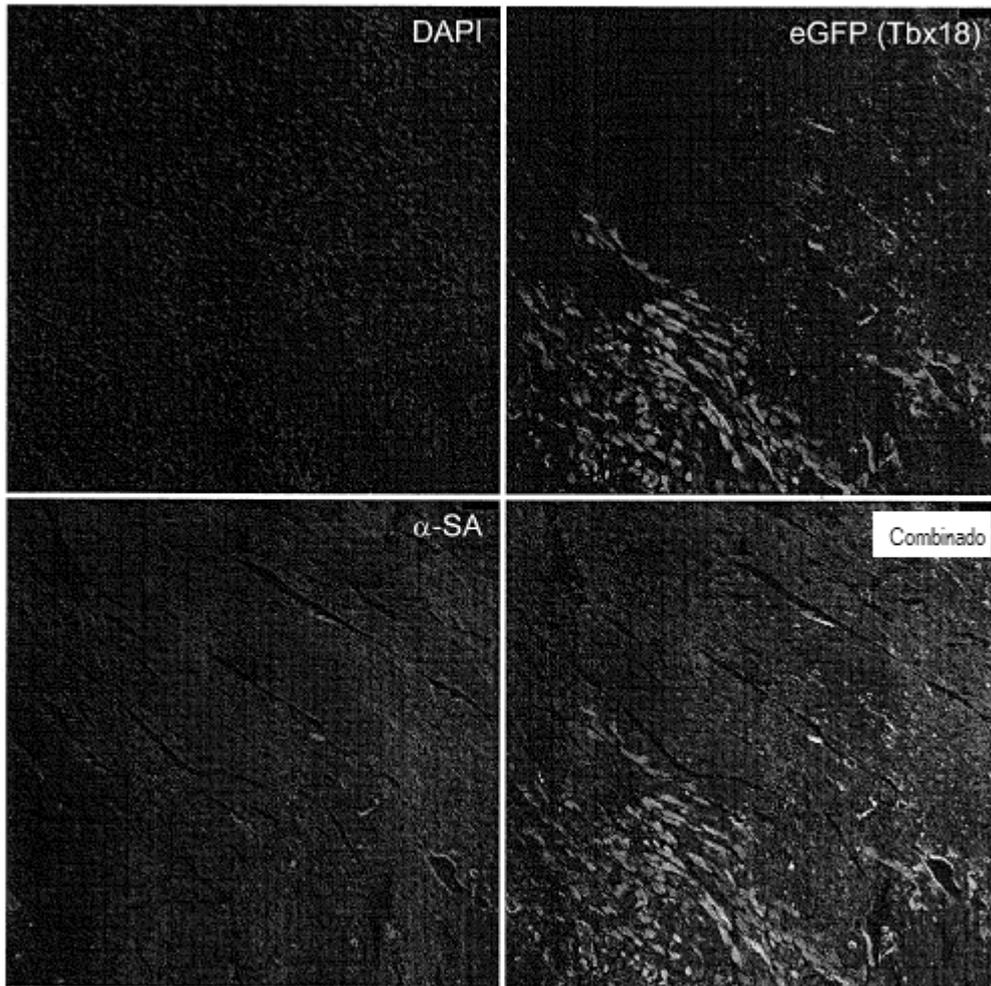


FIG. 27A

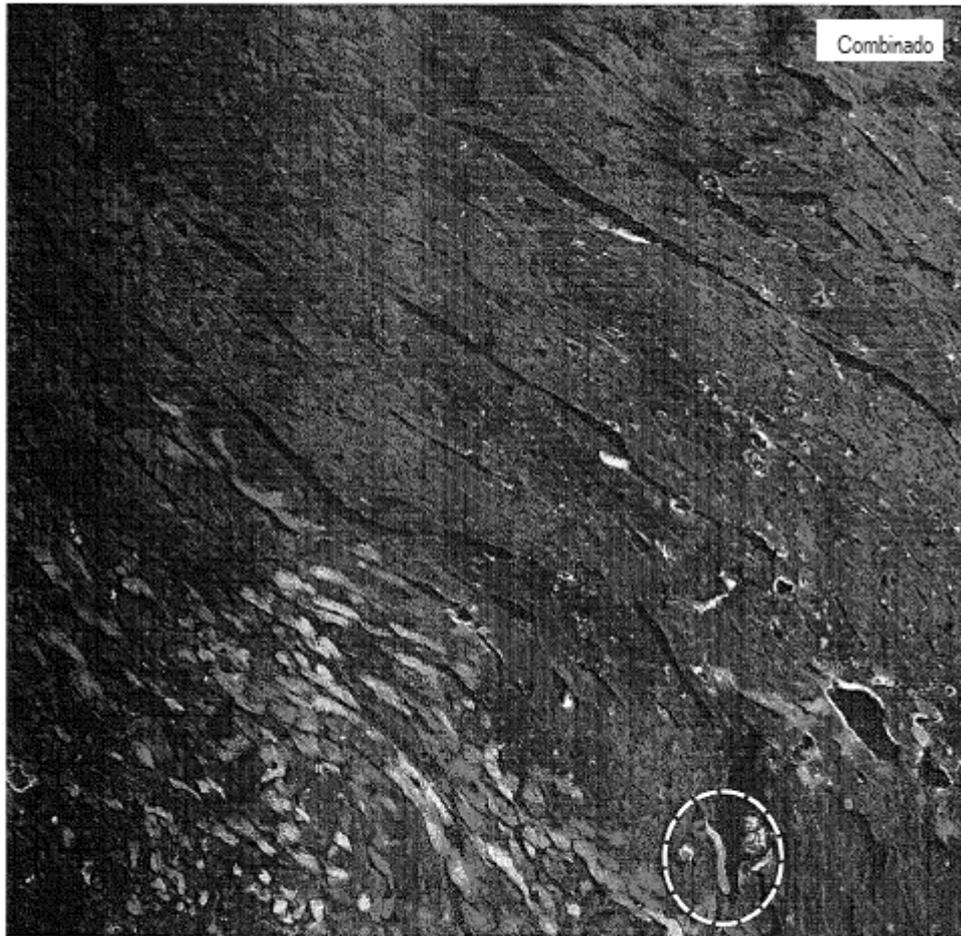


FIG. 27B

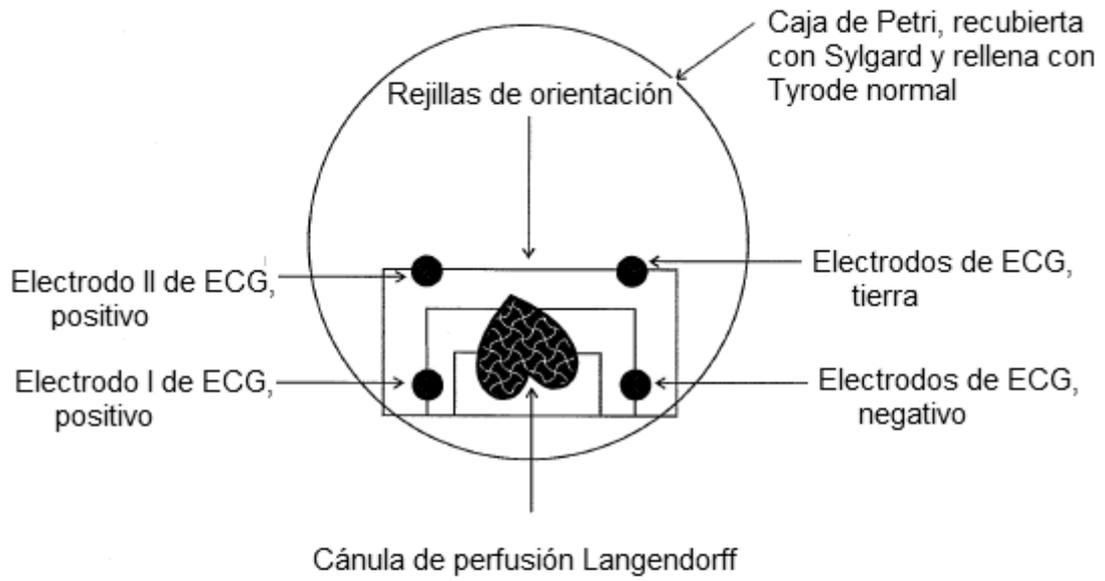


FIG. 28A

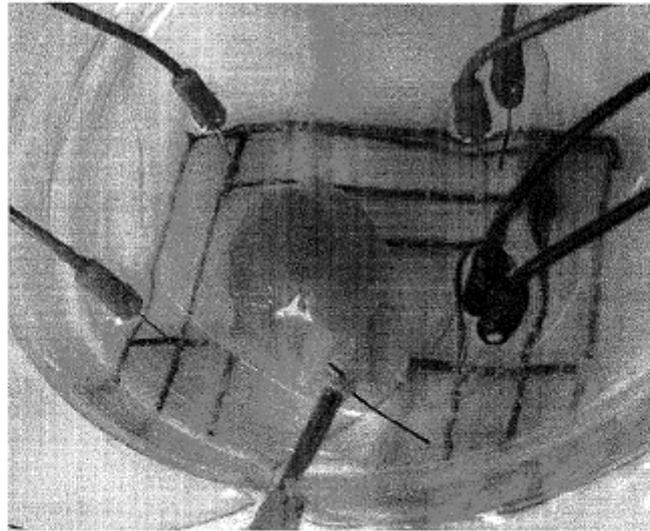


FIG. 28B

Tbx18-corazón (semana 3)

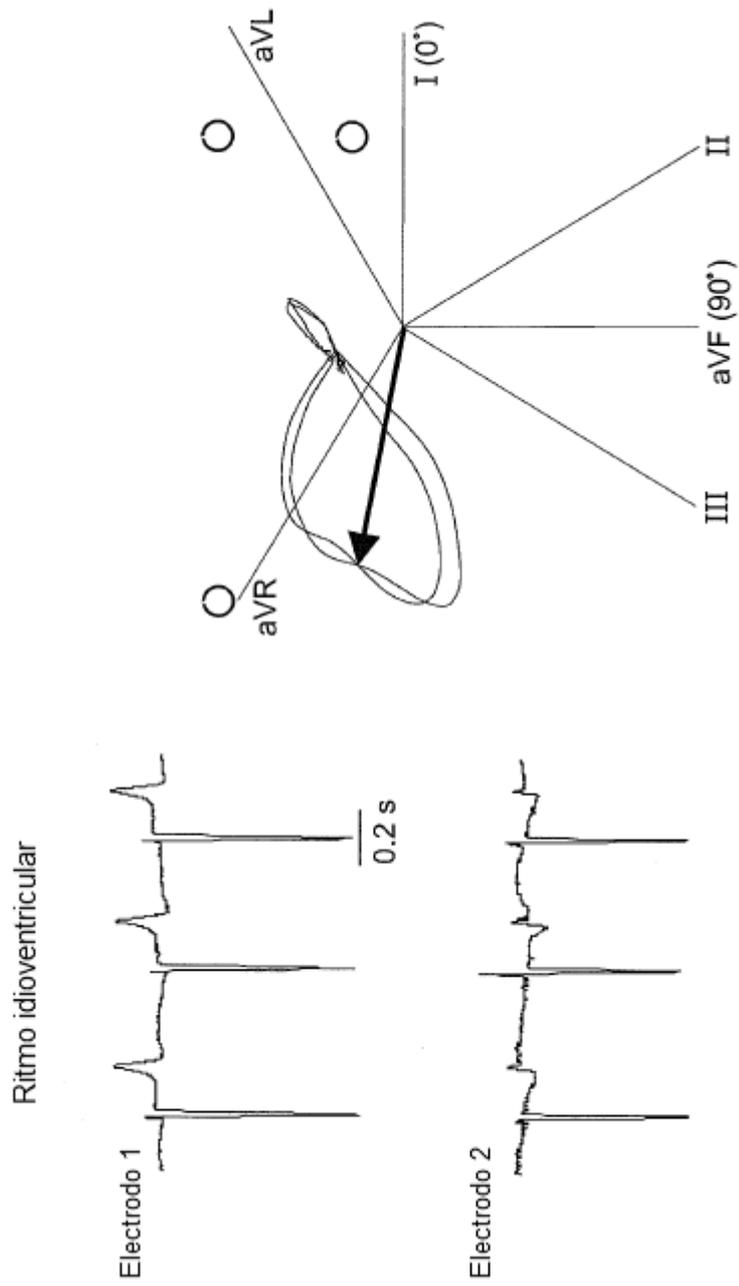


FIG. 29A

Tbx18-corazón (semana 3)

Estimulación en el sitio de inyección (ápice LV)

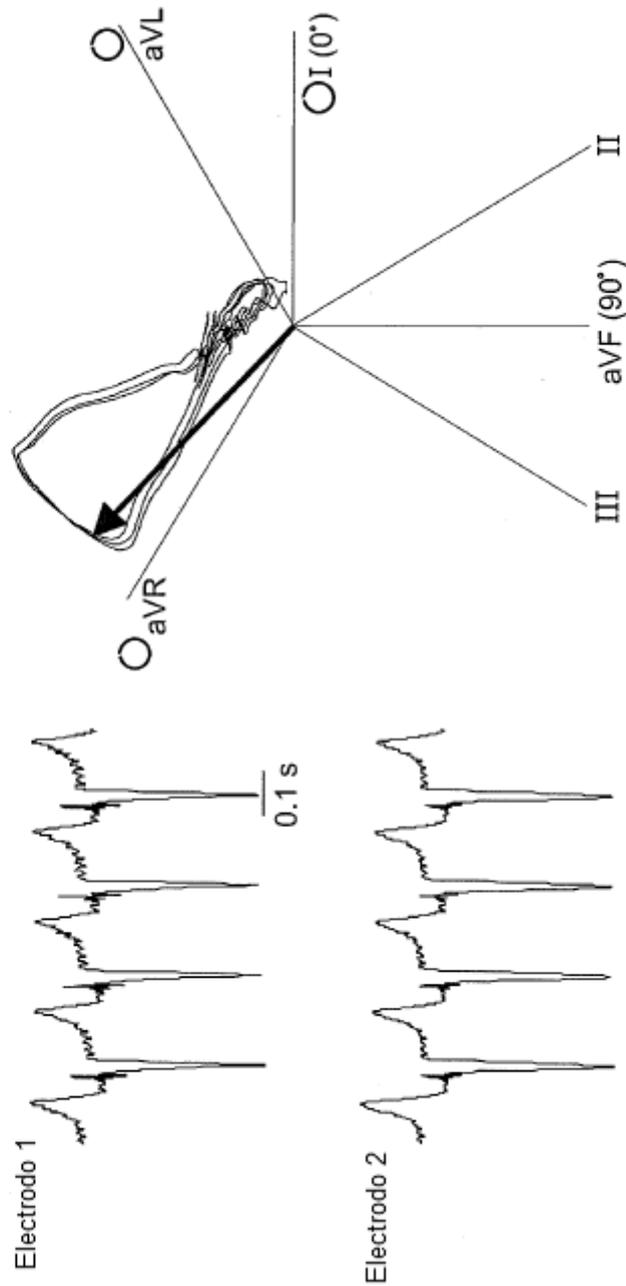


FIG. 29B

Tbx18-corazón (semana 3)

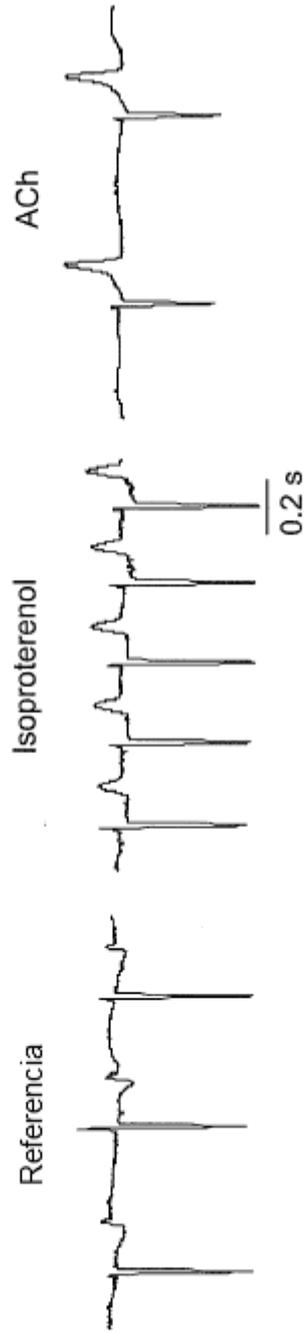


FIG.29C

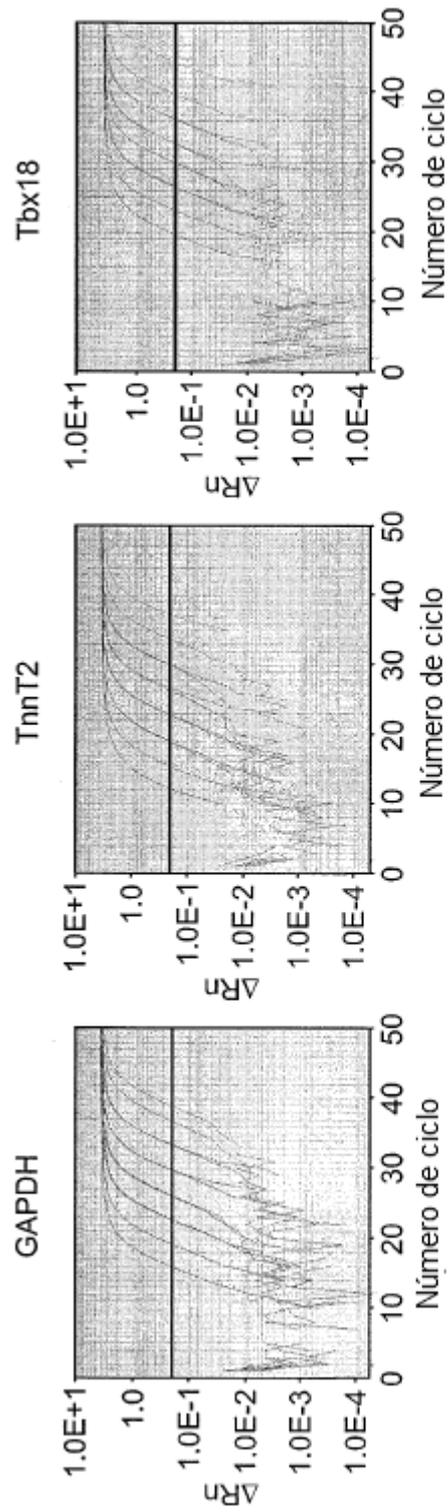


FIG.30A

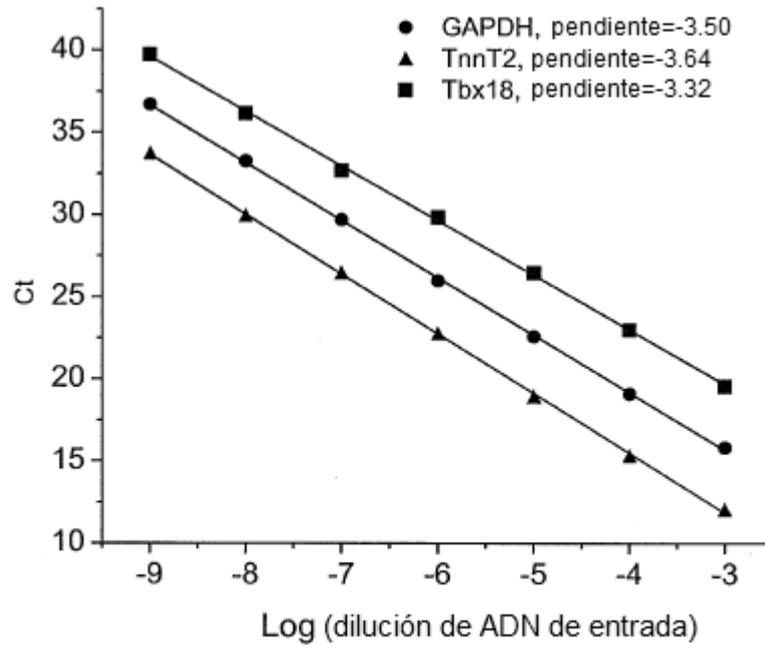


FIG. 30B