

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 765**

51 Int. Cl.:

G01N 33/487 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.05.2014 PCT/US2014/038611**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014 WO14186793**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2014 E 14798347 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2997129**

54 Título: **Expresión electrónica del rectificador interno en cardiocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas por el ser humano**

30 Prioridad:

17.05.2013 US 201361824507 P

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

02.12.2019

73 Titular/es:

**THE RESEARCH FOUNDATION FOR THE STATE UNIVERSITY OF NEW YORK (100.0%)
Technology Transfer, University at Buffalo, UB Commons, 520 Lee Entrance, Suite 109 Buffalo, New York 14228-2567, US**

72 Inventor/es:

**RASMUSSEN, RANDALL, LEE y
BETT, GLENNA, C.L.**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 733 765 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

Expresión electrónica del rectificador interno en cardiocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas por el ser humano

5

[0001] Esta solicitud reclama prioridad a la solicitud provisional de EE. UU. n.º 61/824,507, presentada el 17 de mayo de 2013.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

[0002] El término “células madre pluripotentes inducidas”, o iPSCs, se refiere a un tipo de célula madre pluripotente preparada artificialmente a partir de una célula no pluripotente. Los miocitos cardíacos derivados de las iPSCs son un sistema experimental útil que tiene un gran potencial. Ofrecen una preparación humana innovadora para la reparación cardíaca, pruebas y diseño de seguridad de medicamentos, el diagnóstico clínico y la investigación. Los miocitos cardíacos derivados de las iPSCs ofrecen la oportunidad de trabajar en células que recapitulan la actividad de los miocitos cardíacos de humanos sanos, que por lo demás raramente están disponibles para una investigación experimental exhaustiva. Los miocitos cardíacos derivados de las iPSC humanas ofrecen la capacidad de desarrollar herramientas de predicción para la función cardíaca.

15

20

[0003] A pesar de las posibilidades de los miocitos cardíacos derivados de las iPSC, se han observado problemas con esta estrategia, lo que ha generado serias preocupaciones acerca de su uso en el estudio de los mecanismos arritmogénicos y el análisis de la seguridad de medicamentos. Los potenciales de acción (APs) de los miocitos cardíacos humanos derivados de las iPSCs se denominan a menudo como “fenotipo inmaduro”. La falta de la morfología clásica esperada del tipo de espiga y cúpula de los AP ha llevado a serias preocupaciones sobre la capacidad de los miocitos cardíacos humanos derivados de las iPSC para ser usados para estudiar la base genética del síndrome de Brugada y otras arritmias relacionadas con las ondas J o la repolarización temprana. Además de un perfil de repolarización aparentemente menos complicado, los miocitos cardíacos de las iPSC también muestran actividad contráctil espontánea. Esta actividad contráctil se acompaña de la correspondiente despolarización diastólica que produce Aps espontáneas. Por lo tanto, aunque se puede inducir a las iPSC a desarrollarse en células similares a los miocitos cardíacos, no pueden mostrar propiedades electrofisiológicas que permitan el uso de estas células en la evaluación de la función de las células cardíacas o el uso para el análisis de medicamentos que afecten a las células cardíacas.

25

30

35

[0004] Davis R P et al: “Los cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes recapitulan las características electrofisiológicas de un síndrome de superposición de la enfermedad cardíaca del canal de sodio”. CIRCULATION, LIPPINCOT WILLIAMS AND WILKINS, BALTIMORE, USA, vol. II. 125, n.º 25, 26 de junio de 2012, páginas 3079-3091, XP002741151, ISSN: 1524-4539, DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.066092 demuestra que tanto las células madre embrionarias como los cardiomiocitos derivados de la iPSC pueden recapitular las características de una mutación combinada de la ganancia y la pérdida de la base del canal de Na⁺ y que la inmadurez electrofisiológica de los cardiomiocitos derivados de la iPSC no impide su uso como modelo preciso para la enfermedad del canal de Na⁺ cardíaco.

40

45

[0005] Knollmann “Cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas: Boutique Science or Valuable Arrhythmia Model?”, CIRCULATION RESEARCH. Vol. 112, n.º 6, 15 de marzo de 2013, páginas 969-976, XP055341969, US ISSN: 0009-7330, DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300567 discute las fortalezas y limitaciones de los cardiomiocitos derivados con células madre pluripotentes inducidas (iPSC-CM) de los modelos de arritmias cardíacas.

RESUMEN DE LA INVENCION

50

[0006] Según aspectos de la invención hay sistemas y procedimientos proporcionados según las reivindicaciones anexadas.

55

[0007] En la presente divulgación, evaluamos el papel de la reducción de la corriente rectificadora interna (I_{K1}) en los miocitos derivados de las iPSC humanas mediante la adición electrónica de un componente I_{K1} a estos miocitos cardíacos bajo abrazadera de corriente. Esta estrategia indica la fuerte influencia del I_{K1} y el grado en que su expresión produce grandes diferencias fisiológicas en la repolarización y en el comportamiento potencialmente arritmogénico. Demostramos que el reemplazo artificial de I_{K1} produce miocitos cardíacos derivados de las iPSC humanas con APs que se asemejan mucho más al comportamiento de los APs de miocitos cardíacos humanos recién aislados.

60

65

[0008] En un caso, esta divulgación proporciona un sistema para mejorar la morfología potencial de acción en los miocitos cardíacos derivados de las iPSC. La morfología AP mejorada puede incluir, por ejemplo, potenciales fisiológicos de membrana en reposo y potenciales de acción de picos y domos. El sistema comprende de un parche de corriente con un electrodo para medir la tensión de la membrana del miocito y un circuito generador en la comunicación eléctrica con el electrodo. El circuito generador está configurado para calcular el valor de una corriente

rectificadora interna basada en la tensión de la membrana y aplicar una corriente rectificadora interna sintética al miocito basada en el valor calculado.

[0009] Este procedimiento tiene muchas aplicaciones y permitirá un análisis exhaustivo de este sistema electrofisiológico, así como el análisis de medicamentos específicos para los defectos de las células auriculares o ventriculares. Los miocitos cardíacos iPSC de la presente divulgación pueden utilizarse en la interpretación de las canalopatías, el análisis de fármacos y la evaluación de la posible arritmogénesis. Al eliminar muchas de las consecuencias no fisiológicas de la actividad espontánea y el comportamiento inestable, esta herramienta será útil para estudiar la dinámica de la repolarización. Tiene aplicaciones para estudios de investigación sobre la regulación genética de la repolarización en estados de la enfermedad, además de servir de ayuda en la interpretación de datos de estudios de medicamentos y del potencial proarrítmico de los análisis de seguridad. También podría utilizarse para modificar los regímenes de tratamiento sobre la base de los datos obtenidos.

[0010] En un caso, esta divulgación proporciona un procedimiento para producir potenciales de acción habiendo mejorado la morfología en los miocitos cardíacos derivados de las iPSC. El procedimiento comprende los pasos para medir la tensión de la membrana de un miocito; calcular un valor de una corriente rectificadora interna basado en la tensión medida en la membrana; y aplicar una corriente rectificadora interna sintética al miocito, de este modo hace que éste produzca potenciales de acción habiendo mejorado la morfología.

[0011] En un caso, esta divulgación proporciona un procedimiento para distinguir los miocitos cardíacos derivados de las iPSC que tienen características eléctricas similares a las de las células auriculares de los miocitos cardíacos derivados de las iPSC que muestran características eléctricas similares a las de las células ventriculares.

[0012] Fuera del alcance de la invención, esta divulgación proporciona un procedimiento para el análisis de agentes candidatos que pueden afectar las características eléctricas de las células auriculares o ventriculares. El procedimiento consiste en identificar si un miocito cardíaco derivado de la iPSC está mostrando un fenotipo auricular o ventricular y luego probar el efecto de supuestos medicamentos que afectan la función auricular o ventricular.

[0013] Los miocitos cardíacos de la iPSC podrán utilizarse en la interpretación de las canalopatías, el análisis de medicamentos y la evaluación de la posible arritmogénesis. Al eliminar muchas de las consecuencias no fisiológicas de la actividad espontánea y el comportamiento inestable, esta herramienta será útil para estudiar la dinámica de la repolarización. Tiene aplicaciones para estudios de investigación sobre la regulación genética de la repolarización en estados de la enfermedad, además de servir de ayuda en la interpretación de datos de estudios de medicamentos y del potencial proarrítmico de los análisis de seguridad. También podría utilizarse para modificar los regímenes de tratamiento sobre la base de los datos obtenidos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0014]

Figura 1: Organización del sistema de expresión de corriente I_{K1} electrónico. $I_{K1, \text{sintético}}$ se genera en tiempo real en respuesta al potencial de la membrana de miocitos. Para todas las células de este estudio, el potenciómetro se configuró para proporcionar una corriente de salida estándar de 150 pA a -75 mV

Figura 2: APs espontáneos de miocitos cardíacos derivados de las iPSC. (A) PA espontáneos típicos, con despolarización diastólica relativamente lenta, típica de las células del tipo marcapasos y un aumento muy lento (dV/dt_{max}). **(B)** Ejemplo de comportamiento irregular y similar al de un DAD. En general, la actividad espontánea durante abrazadera de corriente mostró una irregularidad sustancial. Esta irregularidad a menudo tenía un intervalo diastólico que fue en gran parte plano con comportamiento ruidoso y aumentos espontáneos y repentinos en el potencial que precedía al inicio del potencial de acción. **(C,D):** Ejemplos de comportamiento similar a EAD en las mismas células. En c, hay una prolongación de alta tensión de los AP en un solo latido alrededor de 0 mV. En d, la célula pasó un tiempo prolongado en una oscilación de bajo tensión (-20 a -40 mV) similar a EAD.

Figura 3: Ritmo de células en reposo y espontáneamente activas. (A) Típico potencial de reposo de una célula en reposo sin ninguna estimulación. **(B)** Ritmo (0,5 Hz para 4 latidos) una célula en reposo (igual que en (A)) inicia un comportamiento complejo y automatizado. **(C)** Escala de tiempo expandida que muestra los APs estimulados. **(D)** Actividad espontánea, muy variable en frecuencia, potencial diastólico, rebasamiento y forma. **(E)** Ritmo (0,25 Hz para 4 latidos) una célula espontáneamente activa (miocito como en (D)), produce un potencial de post-hiperpolarización más consistente y cambia la actividad espontánea. **(F)** La post-hiperpolarización puede verse más fácilmente en una escala de tiempo expandida.

Figura 4: APs antes y después de la expresión sintética I_{K1} y del ritmo. (A) Células de tipo ventricular espontáneas. Estas células muestran un AP redondeado, pero son difíciles de distinguir porque el potencial diastólico relativamente alto reduce el dV/dt_{max} . El "hombro" de la AP está borrosa por la lenta repolarización de fase IV. **(B)** La expresión electrónica de I_{K1} en (A) restaura un potencial de reposo normal que elimina la inactivación I_{Na} , de este modo

5 aumentando el dV/dt_{max} y restableciendo otras corrientes. El reajuste de corrientes como la de I_{to} produce el clásico "pico y domo" morfología de las células ventriculares. **(C)** Células similares a las auriculares que laten espontáneamente y que tienen una morfología difícil de distinguir de las células ventriculares o nodales. **(D)** La expresión electrónica del I_{K1} revela la naturaleza auricular de las células del panel c. Al igual que con las células ventriculares, el potencial negativo en reposo restaura un dV/dt normal y revela el pico característico y la fase de repolarización baja y más triangular típica de las células auriculares. **(E,F)** Detalles de la repolarización de AP **(E)** de tipo auriculares y **(F)** de tipo ventriculares en escala de tiempo expandida. **(G)** Diagrama de dispersión de la relación APD_{30}/APD_{90} vs. APD_{30} para células con expresión electrónica de I_{K1} .

- 10 **Figura 5: Efectos del agonista del canal del calcio BayK8644. (A)** APs estimulados a una duración del ciclo de 4s. La automaticidad intrínseca causó que algunos APs se acortaran mucho, y algunos estímulos ocurrieron durante la repolarización de un latido espontáneo anterior. Tres rastros se superponen. **(B)** La misma célula, con 1 μM BayK8644. BayK8644 causó una carga de calcio que puso fin a la actividad espontánea. Los APs estimulados mostraron un comportamiento anormal con una repolarización severamente acortada y poca evidencia de despolarización regenerativa. Tres rastros se superponen. **(C)** La misma célula que (A,B) pero con expresión electrónica de $I_{K1}^{synthetic}$. El AP tiene una morfología de pico y domo normal, y un APD_{90} consistente. Estos rastros fueron registrados antes de B. **(D)** La misma célula que en (A,B,C), con $I_{K1}^{synthetic}$ y 1 μM de BayK8644. La APD es prolongada y se observa el fenómeno arritmogénico de los alternanos. Algunos APs fueron interrumpidos por el estímulo posterior. A pesar de la naturaleza invariable del tiempo de I_{K1} , la expresión electrónica de I_{K1} hace que la observación del fenómeno dinámico de los alternanos sea fácilmente observable. Además de la prolongación del QT, los cambios en el umbral para los alternanos son un importante índice celular de potencial pro-aritmico. **(E)** APD_{90} es poco modificado por $I_{K1}^{synthetic}$ (n=7). Esto puede parecer paradójico, pero el efecto neto de la adición de I_{K1} es la prolongación de la parte del domo de la repolarización y el aumento de la tasa de las etapas finales (o pie) de la repolarización. El resultado es sólo un cambio modesto en APD_{90} . **(F)** La relación de APD_{90} con/sin BayK8644 muestra un aumento importante de APD con una expresión $I_{K1}^{synthetic}$, y disminución anómala de APD_{90} sin ella.

La figura 6 es un diagrama de flujo que representa un procedimiento según un caso de la presente divulgación. La figura 7 es un diagrama de flujo que representa un procedimiento fuera del alcance de la invención. La figura 8 es un diagrama de flujo que representa otro procedimiento fuera del alcance de la invención.

30 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0015] La presente divulgación proporciona un procedimiento para impartir morfología potencial de acción fisiológica, en relación con las células nativas, a los miocitos cardíacos derivados de las iPSC. El procedimiento comprende añadir electrónicamente un componente I_{K1} a los miocitos cardíacos bajo abrazadera de corriente. Demostramos que el reemplazo artificial de I_{K1} produce miocitos cardíacos derivados de las iPSC humanas con APs que se asemejan mucho más al comportamiento de los APs de miocitos cardíacos humanos recién aislados.

[0016] Las iPSCs pueden prepararse a partir de una célula no pluripotente, normalmente una célula somática adulta, o de una célula diferenciada terminal, como un fibroblasto, una célula hematopoyética, un miocito, una neurona, una célula epidérmica, etc., introduciéndola en las células o poniéndola en contacto con las células con factores de reprogramación. Las células madre pluripotentes inducidas se pueden diferenciar en miocitos cardíacos. Por ejemplo, los fibroblastos humanos adultos pueden ser transfectados con los factores de transcripción Oct4, Sox2, c-Myc y/o Klf4 usando transducción retroviral, o con Oct4, Sox2, Nanog y Lin28 usando transducción lentivirus. Para un análisis de los miocitos cardíacos derivados de las iPSC, véase EE.UU. Patente n.º 8,415,155.

[0017] Después de introducir los factores de reprogramación en las células somáticas, estas células pueden cultivarse en un medio suficiente para mantener la pluripotencia y el estado indiferenciado. Los procedimientos de cultivo y los medios para el mantenimiento de las iPSCs en el cultivo son bien conocidos.

[0018] Las células del linaje de los cardiomiocitos pueden obtenerse a partir de células madre indiferenciadas mediante cultivo o diferenciación en un entorno de crecimiento especial que enriquece a las células con el fenotipo deseado. Por ejemplo, esto puede lograrse mediante el crecimiento de las células deseadas, o por inhibición o muerte de otros tipos de células. Los detalles se pueden encontrar en EE.UU. Patente 8,415,155. Esto proporciona miocitos cardíacos derivados de las iPSC. Además, los miocitos cardíacos derivados de las iPSC también están disponibles en el mercado.

[0019] Para registrar la actividad eléctrica de los miocitos cardíacos derivados de las iPSCs, se pueden utilizar técnicas de tensión de célula completa o de abrazadera de corriente. Generalmente, estas técnicas implican la formación de un gigaseal usando procedimientos convencionales.

[0020] Los miocitos cardíacos derivados de la iPSC suelen generar potenciales de acción que tienen un efecto "redondo" morfología con un golpe ascendente lento. El alto MDP reduce el dV/dt_{max} y es difícil distinguir las células ventriculares de las auriculares basándose en la morfología AP.

[0021] Con referencia a la fig. 1, la presente divulgación puede ser incorporada como un sistema **10** para mejorar la morfología potencial de acción en un miocito cardíaco derivado de la iPSC **90**. La morfología del potencial de acción mejorada incluye, por ejemplo, un potencial fisiológico estable de la membrana en reposo y/o una morfología del potencial de acción fisiológica. El sistema **10** se compone de una abrazadera de parche **12** como se conoce en el arte. La abrazadera de parche **12** es un aparato de electrodo único configurado para la medición de una célula completa. Como tal, la abrazadera de parche **12** se compone de un electrodo **14**. El electrodo **14** puede ser, por ejemplo, una micropipeta de vidrio llena de una solución conductora. Tal electrodo ejemplar puede ser configurado para formar un sello de gigaohm con la célula a medir. La abrazadera de parche **12** está configurada para medir una tensión de la membrana (V_m) del miocito **90**.

[0022] La abrazadera de parche **12** está configurada para medir el potencial de acción del miocito **90**. En algunas realizaciones, la abrazadera de parche **12** se configura como abrazadera de corriente y proporciona una corriente de estimulación (I_{STIM}) a la célula **90** a través del electrodo **14**. De este modo, la abrazadera de parche **12** puede configurarse para registrar el potencial de acción de la célula **90** a lo largo del tiempo mediante el muestreo (medición) de la tensión de la membrana a una frecuencia de muestreo.

[0023] El sistema **10** comprende de un circuito generador **20** en comunicación eléctrica con el electrodo **14** de la abrazadera de parche **12**. El circuito generador **20** está configurado para recibir una señal eléctrica del electrodo **14**, donde la señal eléctrica indica una tensión medida en la membrana. De esta manera, el circuito generador **20** recibe una tensión medida en la membrana del electrodo **14**. El circuito generador **20** está configurado para calcular el valor de una corriente rectificadora interna (I_{K1}) basada en la tensión de la membrana del electrodo **14**. Por ejemplo, la corriente rectificadora interna puede calcularse a partir de la tensión de la membrana según la ecuación:

$$I_{K1} = 0,5 \left(\frac{V_m + 85}{1 + e^{0,0896(V_m + 85)}} \right) + 0,01(V_m + 85). \quad (1)$$

Otras relaciones entre la tensión de la membrana y la corriente rectificadora interna serán aparentes a la luz del presente

[0024] El circuito generador **20** está además configurado para proporcionar una corriente rectificadora interna sintética ($I_{SYNTHETIC}$) al electrodo **14**. La corriente rectificadora interna sintética proporcionada por el circuito generador **20** corresponde al valor de I_{K1} calculado por el circuito generador **20**. En algunos casos, la corriente rectificadora interna sintética es igual al valor calculado de la corriente rectificadora interna ($I_{SYNTHETIC} = I_{K1}$). En algunos casos $I_{SYNTHETIC}$ puede ser diferente de I_{K1} . Por ejemplo, el circuito generador **20** puede comprender además un potenciómetro **22**, y la corriente suministrada ($I_{synthetic}$) puede atenuarse de tal manera que $I_{SYNTHETIC} < I_{K1}$.

[0025] En algunos casos, el circuito generador **20** comprende un procesador, y el procesador está programado para calcular el valor de la corriente rectificadora interna. Será aparente a la luz de la divulgación presente que el circuito generador **20** puede ser implementado usando un procesador (p.ej., con software), componentes electrónicos discretos, circuitos integrados específicos de aplicación, matrices de puerta programables en campo, o combinaciones de estas u otras configuraciones.

[0026] El sistema **10** puede comprender un circuito sumador **30** configurado para añadir la corriente rectificadora interna sintética ($I_{SYNTHETIC}$) a la corriente de estimulación (I_{STIM}) de la abrazadera de parche **12**, produciendo una corriente de entrada (I_{input}). De esta manera, la corriente sintética se suministra al electrodo **14** como componente de la corriente de entrada.

[0027] El sistema **10** puede ser utilizado continuamente de tal manera que, en un caso que tenga una implementación digital, la tensión de la membrana es medido repetidamente a lo largo del tiempo a una frecuencia de muestreo, y las correspondientes corriente rectificadora interna sintética son suministradas a la célula **90** por medio del electrodo **14**. Cabe señalar que una pluralidad de corrientes puede ser implementada como una corriente eléctrica continua que varía con el tiempo según la corriente sintética de cada período de tiempo.

[0028] El circuito generador **20** puede comprender además un interruptor **24** para desconectar selectivamente el circuito generador **20** de tal manera que no se suministre al electrodo una corriente rectificadora interna sintética **14**.

[0029] La presente divulgación también se relaciona con un procedimiento **100** para producir potenciales de acción regulares a partir de un miocito derivado de la iPSC (véase, por ejemplo, la fig. 6). El procedimiento **100** comprende el paso de medir **103** una tensión de la membrana (V_m) del miocito. Por ejemplo, una abrazadera de parche puede utilizarse en una configuración de célula entera para medir **103** la tensión de la membrana. El valor de una corriente rectificadora interna (I_{K1}) se calcula **106** a partir de la tensión medida en la membrana. En algunos casos, el

valor se calcula **106** según la ecuación (1) anterior. En algunos casos, el valor se calcula **106** usando un procesador. Por ejemplo, una computadora puede ser configurada para recibir la tensión **103** medida en la membrana y programada para calcular **106** una corriente rectificadora interna basada en la tensión recibida de la membrana. Otras técnicas para calcular **106** la corriente rectificadora interna, serán aparentes a la luz de la presente divulgación.

5

[0030] El procedimiento **100** comprende además el paso de aplicar **109** una corriente rectificadora interna sintética (ISYNTHETIC) al miocito, de este modo hace el miocito produzca potenciales de acción regulares. La corriente se puede aplicar **109** por medio de un electrodo de una abrazadera de parche. La corriente rectificadora interna sintética corresponde al valor **106** calculado. En algunos casos, la corriente sintética **109** aplicada es igual a la corriente rectificadora interna calculada **106**. En algunos casos, la corriente sintética aplicada **109** es menor que la calculada **106**, por ejemplo, cuando se utiliza un potenciómetro para atenuar la corriente.

10

[0031] En algunos casos, se suministra una abrazadera de parche **150** y se configura para medir **103** la tensión de la membrana del miocito mediante un electrodo. La abrazadera de parche puede configurarse como una abrazadera de corriente, y se aplica una corriente de estimulación (I_{stim}) al miocito. En tal caso, la corriente rectificadora interna sintética puede añadirse **153** a la corriente de estimulación para producir una corriente de entrada I_{INPUT} que se aplica al miocito a través del electrodo. Como tal, la corriente sintética se aplica **109** al miocito como componente de la corriente de entrada.

15

[0032] Fuera del alcance de la invención, un procedimiento puede ser además utilizado para determinar si un miocito derivado de la iPSC exhibe características ventriculares o características auriculares. Por ejemplo, tal procedimiento **200** fuera del alcance de la invención puede incluir el paso de muestrear **203** una tensión de la membrana de un miocito derivado de la iPSC durante un período de tiempo y en una frecuencia de muestreo (véase, por ejemplo, fig. 7). Se calcula una pluralidad de valores de corrientes rectificadoras internas sintéticas **206**, cada valor correspondiente a una tensión de la membrana muestreada de **203**. Los valores pueden calcularse **206** según la ecuación (1). El procedimiento **200** comprende el paso de la aplicación **209** de una corriente rectificadora interna sintética al miocito según los valores calculados de **206** de la corriente rectificadora interna. Se puede determinar que el miocito **212** presenta características ventriculares o auriculares basadas en los potenciales de acción basados en la morfología de los potenciales de acción resultantes.

20

25

30

[0033] Si se determina que el miocito **212** presenta características ventriculares, el procedimiento **200** puede incluir el paso de modulación **215** de la corriente rectificadora interna sintética **209** aplicada, de manera que el potencial de acción del miocito coincida más estrechamente con el potencial de acción de un miocito ventricular. Si se determina que el miocito **212** presenta características ventriculares, el procedimiento **200** puede incluir el paso de modulación **218** de la corriente rectificadora interna sintética **209** aplicada, de manera que el potencial de acción del miocito coincida más estrechamente con el potencial de acción de un miocito ventricular.

35

40

45

50

55

[0034] Fuera del alcance de la invención, la presente divulgación también se relaciona con un procedimiento **300** para identificar agentes de prueba para el desarrollo de medicamentos (véase, por ejemplo, fig. 8). El procedimiento **300** comprende los pasos para proporcionar **303** miocitos cardíacos derivados de la iPSC y **306** un sistema para aplicar una corriente rectificadora interna sintética, como el sistema **10** describe anteriormente. Se genera un patrón de potenciales de acción habiendo mejorado la morfología **309** utilizando el sistema. El miocito puede presentar potenciales de acción característicos de un miocito ventricular o de un miocito auricular. El miocito es contactado **312** con un agente de prueba. El agente de prueba se identifica **315** como candidato para el desarrollo de medicamentos en función de las características de los potenciales de acción del miocito. Por ejemplo, el agente de prueba puede ser identificado **315** como candidato si las características de los potenciales de acción individuales se cambian de tal manera que los potenciales de acción se vuelven más o menos en forma triangular, se prolongan o acortan, se cambia la regularidad de los potenciales de acción, se producen cambios en el período refractario o se producen cambios en el comportamiento de restitución. En otros ejemplos, sin limitación, el potencial de acción cambia en su duración, grado de triangulación, período refractario, pendiente de restitución, límite para el desarrollo de alternanos, o umbral para un comportamiento inestable o caótico. El procedimiento **300** puede comprender además el paso de contactar **318** al miocito derivado de la iPSC con un segundo agente de prueba (después de contactar **312** al miocito con el (primer) agente de prueba como se describe anteriormente). El segundo agente de prueba puede seleccionarse para restaurar las características modificadas del miocito a las características anteriores al contacto **312** con el primer agente de prueba.

60

65

[0035] Los procedimientos descritos tienen muchas aplicaciones. Por ejemplo, un procedimiento permitirá un análisis exhaustivo del sistema electrofisiológico humano. Los cardiocitos iPSC pueden utilizarse en la interpretación de las canalopatías, el análisis de medicamentos y la evaluación de arritmogénesis potenciales. Al eliminar muchas de las consecuencias no fisiológicas potencialmente confusas de la actividad espontánea y el comportamiento inestable de los miocitos cardíacos derivados de las iPSC humanas, este procedimiento proporciona una herramienta útil para estudiar la dinámica de la repolarización. Tiene aplicaciones para estudios de investigación sobre la regulación genética de la repolarización en estados de la enfermedad, además de servir de ayuda en la interpretación de datos de estudios de medicamentos y del potencial proarrítmico de los análisis de seguridad.

[0036] El sistema y los procedimientos descritos en la presente divulgación pueden utilizarse para las iPSC de seres humanos o de otros animales, incluidos, por ejemplo, los mamíferos.

[0037] El siguiente ejemplo se proporciona para ilustrar mejor la divulgación.

5

EJEMPLO

Métodos

10 Preparación de la célula

[0038] Los miocitos cardíacos derivados de la iPSC (iCell Dynamics, WI), disponibles en el mercado, fueron preparados según las instrucciones del fabricante. Brevemente, los miocitos cardíacos iCell (suspensiones unicelulares criopreservadas en criovirales de 1 ml) fueron almacenados en nitrógeno líquido. Los viales se descongelaron en un baño de agua (37 °C). Las células se lavaron y luego se enjuagaron con 1 ml de "Medio de Revestimiento iCell para Cardiomiocitos" RT. Se agregaron 8 ml adicionales de medio de revestimiento y se mezclaron las células con la solución mediante inversión gentil. Los cardiocitos fueron sembrados en cubreobjetos de 15 mm recubiertos con una solución de gelatinosa al 0,01 % (w/v) en placas de 12 pocillos. Los cardiocitos fueron sembrados (20,000-40,000/plato) en 2ml de medio de revestimiento RT, permitiendo el cultivo de una sola célula, e incubados por 2+ días a 37 °C, 7 %CO₂. Las células no adherentes se eliminaron enjuagando con "Medio de Mantenimiento iCell para Cardiomiocitos". Además se añadieron otros 2 ml de medio de mantenimiento. El medio de mantenimiento se cambiaba cada 2 días y las células se utilizaban en el plazo de 1 semana.

Electrofisiología

25

[0039] Los cardiocitos derivados de la iPSC fueron sometidos a abrazadera de tensión. Las corrientes se registraron utilizando abrazadera de célula entera en RT. Las células de la cámara de grabación (300µl) fueron perfundidas continuamente con Tyrode. Pipetas fabricadas en vidrio de borosilicato (Extractor de micropipeta horizontal Flaming/Brown) y puntas pulidas con calor (Narishige microforge). Pipetas contenidas (mM): 10 NaCl, 125 KCl, 1 MgSO₄, 5 EGTA, 5 ATP(Mg salt), 5 Tris-creatinfosfato, 0,3 GTP, 10 HEPES, pH 7,2. Solución extracelular (mM): 150 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 Na₂HPO₄, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 glucosa, 10 HEPES, pH 7,4. Después de establecer un sello (1-10Gohm), se usaron pulsos de succión y tensión para romper el parche. Se registraron las corrientes (Axopatch-1D, Molecular Dynamics, CA) y se conectaron a un ordenador Pentium 4 mediante un Digidata 1322A (Molecular Dynamics, CA). Se utilizó PClamp 9.0 (Molecular Dynamics, CA) para controlar los protocolos y la adquisición de datos.

Interfaz In Silico

[0040] Utilizamos una tarjeta de E/S analógica y digital PCIe-DAS1602/16 (Measurement Computing Corporation) instalada en una estación de trabajo Dell Precision T7500 con 2 CPU Intel Xeon E5520 para transferir la señal V_m a la señal de corriente I_{K1} . El código fuente está en el suplemento.

Análisis de datos

[0041] El análisis se realizó utilizando pClamp 9 (Molecular Dynamics). Se calculó la duración potencial de acción (DPA) para el 50 % (APD₅₀) y el 90 % (APD₉₀) de repolarización en ms. La tasa máxima de aumento de la carrera ascendente AP se determinó (dV_m/dt_{max}) en mV/ms. El potencial de la membrana en reposo se registró antes de cada AP.

50 Para las APs espontáneas, las características diastólicas se informaron para el período de tiempo entre la repolarización completa de la AP y el comienzo de la despolarización en la AP posterior. Se calcularon la duración y los potenciales mínimos y medios para el período diastólico.

Análisis estadístico

55

[0042] Los resultados se presentan como media±s.e.m. Las diferencias se analizaron mediante la prueba-t o ANOVA, según correspondiera, y p<0,05 se consideraron estadísticamente significativas.

Resultados

60

[0043] Para superar la falta de I_{K1} en los miocitos cardíacos derivados de la h-iPSC, desarrollamos una variación del enfoque de abrazadera dinámica para inyectar una versión sintética de I_{K1} (**figura 1**). El centro del sistema es el miocito cardíaco aislado derivado de la h-iPSC bajo tensión de célula completa o abrazadera de corriente. La abrazadera de célula entera se logra con un gigaseal bajo el modo de abrazadera de corriente convencional. La tensión de la membrana del miocito cardíaco es emitida desde el amplificador y alimentado a una computadora a través de un

65

digitalizador el que calcula la corriente rectificadora interna para el potencial de la membrana, según la ecuación mostrada en la figura 1. El valor calculado de $I_{K1, Synthetic}$ se pasa a través de un potenciómetro (utilizado para ajustar la amplitud sin sacrificar la resolución digital) a escala I_{K1} y luego se suma con la entrada de estimulación estándar de pClamp. Un interruptor permite cambios rápidos entre la abrazadera de corriente convencional y la entrada sumada.

5 Cuando se enciende la entrada sumada, el miocito recibe la suma de dos entradas: la corriente de estímulo AP estándar más $I_{K1, Synthetic}$, del simulador de corriente en tiempo real. La electrónica de abrazadera de tensión estándar se puede accionar a través del circuito sumador sin modificar la abrazadera de tensión convencional y el registro de datos con sólo cambios menores de selección de software de los canales de entrada/salida. El resultado es una célula que se comporta como si estuviera expresando un I_{K1} nativo que ha sido instantáneamente “transfectado” en la célula.

10

Propiedades y Variabilidad de los APs de miocitos cardíacos derivados de la iPSC

[0044] La mayoría de los informes de los cardiocitos derivados de la iPSC indican que generalmente son espontáneamente activos, con unas pocas células en reposo, lo que es consistente con nuestros hallazgos. En consecuencia, la mayoría de los estudios AP hasta la fecha sobre cardiocitos derivados de la iPSC han reportado parámetros basados en el análisis del comportamiento espontáneo del AP. Dado el alto grado de variabilidad de célula a célula, se ha utilizado un gran número de células para producir resultados estadísticamente significativos en los cambios de los parámetros AP. Incluso se han empleado procedimientos de análisis de alto rendimiento para examinar las propiedades celulares de los miocitos cardíacos derivados de la iPSC disponibles en el mercado. Esto refleja, al menos en parte, la variabilidad entre los tipos de células, por ejemplo, las células ventriculares, auriculares y nodales. Sin embargo, parte de esta variabilidad también se debe a las consecuencias del registro de células espontáneamente activas. El potencial diastólico máximo promedio para las células espontáneamente activas fue de -59 ± 2 mV ($n=33$). La actividad espontánea fue generalmente irregular y ocurrió en un amplio rango de intervalos diastólicos de unos pocos cientos de ms a 8 s (promedio: 2068 ± 415 ms, $n=25$) e incluía una alta variabilidad de latido a latido para cualquier célula individual dada (véase **fig. 2**). No es sorprendente que la variabilidad en la frecuencia cardíaca fuera acompañada por una alta variabilidad en la duración y forma del AP. Como se muestra en la **tabla 1**, los AP espontáneos tendían a tener una amplitud relativamente corta y un golpe ascendente muy lento (**Fig 2A,B**). Este comportamiento irregular estuvo a menudo acompañado de eventos espontáneos que se asemejaban a los EADs y las DADs de umbral bajo y alto (**Fig 2C,D**).

30

[0045] Una estrategia para reducir la variabilidad en la actividad eléctrica es a través de la estimulación externa de ritmo. Esto puede regularizar la actividad espontánea lenta y potencialmente inducir el comportamiento eléctrico regenerativo en las células en reposo. No todos los miocitos cardíacos derivados de la iPSC fueron espontáneamente activos (de 33 células probadas, 8 no fueron espontáneamente activas). Sin embargo, incluso las células que no son espontáneamente activas no muestran características del AP normales asociadas con las células miocárdicas adultas humanas del miocardio en funcionamiento. La falta de función contráctil espontánea puede deberse a un potencial de reposo normal estable (alrededor de -85 mV) o puede deberse a un potencial relativamente despolarizado, que resulta en un estado de reposo anormal. La mayoría de las células no espontáneas no tenían un potencial de membrana en reposo hiperpolarizado típico del miocardio en funcionamiento, pero se encontraban en un estado anormalmente despolarizado. Tres de cada 8 células no espontáneamente activas tenían un potencial de reposo superior a -60 mV y sólo 1 tenía un potencial de membrana en reposo inferior a -70 mV. Los APs y la actividad contráctil podrían iniciarse en las células en reposo mediante la estimulación con una corriente de estímulo. Los APs obtenidos se asemejan a los de las células espontáneamente activas. En algunas células en reposo, el ritmo a provocar un período posterior de comportamiento espontáneo (**fig. 3A-C**), lo que indica que las corrientes rectificadoras retardadas producen el potencial diastólico en los miocitos cardíacos derivados de las iPSC humanas. El ritmo del tejido espontáneamente activo alteró la variabilidad de latido a latido (**fig. 3 D-F**) y mejoró algunos otros parámetros, particularmente dV/dt_{max} (tabla 1).

45

[0046] Independientemente ya sea si los Aps surgieron de la actividad espontánea o del ritmo de estimulación, tuvieron una repolarización prolongada (APD_{90} fue de 955 ± 103 ms ($n=38$) y 967 ± 141 ms ($n=30$) respectivamente), una amplitud reducida y una elevación máxima reducida (dV/dt_{max}) en comparación con los Aps de cardiocitos auriculares o ventriculares humanos recién aislados. También carecían de la morfología de pico y domo típica de los miocitos ventriculares y auriculares. Esto fue algo sorprendente ya que las células expresan de manera uniforme el I_{to} robusto que da origen a esta morfología AP. Sin embargo, los canales mediados por $Kv 4,2/4,3$ que dan lugar a esta corriente tienen una inactivación sustancial en estado cerrado y pueden estar en gran medida inactivados por el estado despolarizado de los APs espontáneos y estimulados. De manera similar, el I_{Na} también será inactivado en estos potenciales y no puede contribuir completamente a la subida rápida normal o al comportamiento del pico y domo. La falta de estos comportamientos conducirá a una función no fisiológica y disminuirá en gran medida el valor predictivo de cualquier análisis para el comportamiento pro-arritmico o antiarritmico de los canales mutantes o medicamentos candidatos. Sin embargo, cuando inyectamos $I_{K1, Synthetic}$, se estableció un potencial de membrana en reposo estable y hubo un marcado cambio en la forma y regularidad del AP (**fig. 4**). La morfología de pico y domo se ve claramente, y la diferencia entre los miocitos ventriculares y auriculares es fácilmente aparente, lo que sugiere que este procedimiento permite una discriminación eficiente entre los tipos de células. La **fig. 4G** muestra que las células se dividen en dos poblaciones distintas, basadas en la forma y duración del potencial de acción. La varianza entre los APs tanto de latido a latido como de célula a célula se redujo y el rápido ascenso (dV/dt_{max}) de la fase ascendente del

65

AP fue prominente y consistente (**tabla 1**). Claramente, la reconstitución de I_{K1} restaura muchas propiedades importantes de los miocitos cardíacos derivados de la h-iPSC.

Manipulación farmacológica de la repolarización

5

[0047] La reconstitución del rectificador interno normaliza muchas de las propiedades de los APs cardiocitarios derivados de la h-iPSC en una forma que se asemeja más claramente a la de los miocitos cardíacos en funcionamiento. Además, revela muchas de las propiedades incontroladas asociadas con los APs libres o estimulados. La utilidad funcional de esta propiedad puede apreciarse evaluando el agonista del canal de calcio BayK-8644, que aumenta la

10

amplitud e interrumpe la inactivación del canal de calcio de tipo L, lo que resulta en un profundo aumento de la APD. Se examinó el efecto de 1 μ M BayK-8644 a estimulación de los miocitos cardíacos derivados de la h-iPSC con y sin I_{K1} electrónico (fig. 5). La aplicación de 1 μ M BayK-8644 tuvo efectos profundos en ambos casos. Sin embargo, la prolongación de AP por BayK-8644 no se observó uniformemente en las células estimuladas. Más bien, una

15

terminación de la actividad AP espontánea a escala completa ocurrió debido a la despolarización de la membrana después de la estimulación de un AP muy escorzado. También se observaron oscilaciones eléctricas de bajo nivel similares al fibrilatorio. En contraste, cuando I_{K1} fue insertado electrónicamente, la actividad celular se regularizó, la variabilidad se redujo y el AP fue más fisiológico, y el comportamiento eléctrico similar al fibrilatorio fue suprimido. La aplicación de BayK-8644 resultó en una clara prolongación de AP. A intervalos de estimulación cortos, algunos APs se prolongaron más allá de la tasa de estimulación (**fig. 5D**). Cuando se observa utilizando datos emparejados, esta

20

diferencia cualitativa en el potencial arritmogénico predictivo es claramente evidente (**fig. 5E**) y enfatiza la capacidad de la expresión electrónica I_{K1} para mejorar la capacidad predictiva del sistema de miocitos cardíacos derivados de las iPSC humanas como una herramienta para la seguridad del medicamento y el estudio de la base molecular de las arritmias.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema (10) para producir una morfología potencial de acción mejorada a partir de un miocito cardíaco derivado de la iPSC (90), el sistema (10) que comprende:

5 una abrazadera de parche (12) compuesta por un electrodo (14) configurado para medir la tensión de la membrana (V_m) del miocito (90);

10 un circuito generador (20) en comunicación electrónica con el electrodo (14), el circuito generador (20) configurado para:

calcular el valor de una corriente rectificadora interna (I_{K1}) basada en la tensión de la membrana;

15 proporcionar al electrodo (14) una corriente rectificadora interna sintética en función de la corriente rectificadora interior determinada, para producir potenciales de acción habiendo mejorado la morfología del miocito (90).

2. El sistema (10) de la reivindicación 1, donde el valor de la corriente rectificadora interna sintética se determina según la ecuación:

$$I_{K1} = 0,5 \left(\frac{V_m + 85}{1 + e^{0,0896(V_m + 85)}} \right) + 0,01(V_m + 85).$$

20

3. El sistema (10) de la reclamación 1, donde el circuito generador (20) está configurado para calcular repetidamente un valor y proporcionar una corriente a una frecuencia de muestreo.

25 4. El sistema (10) de la reivindicación 1, donde el circuito generador (20) comprende un procesador programado para:

calcular el valor de una corriente rectificadora interna sintética basada en una tensión de la membrana (I_{K1}) basada en la tensión de la membrana; y

30

proporcionar al electrodo (14) una corriente rectificadora interna sintética en función del valor determinado para producir potenciales de acción habiendo mejorado la morfología del miocito (90).

5. El sistema (10) de la reclamación 1, donde el sistema (10) está configurado para medir el potencial de acción del miocito (90).

35

6. El sistema (10) de la reivindicación 5, donde la abrazadera de parche (12) está configurada como una abrazadera de corriente.

40 7. El sistema (10) de la reivindicación 1, que comprende además un circuito sumador (30) para añadir la corriente rectificadora interna sintética a una corriente de estimulación de abrazadera de parche (12) para producir una corriente de entrada, y el circuito de rectificación interna sintética se suministra al electrodo (14) como componente de la corriente de entrada.

45 8. El sistema (10) de la reivindicación 7, donde el circuito generador (20) comprende además un potenciómetro (22) para atenuar la corriente rectificadora interna sintética antes del circuito sumador (30).

9. Un procedimiento (100) para producir una morfología potencial de acción mejorada a partir de un miocito cardíaco derivado de la iPSC (90), el procedimiento que comprende los pasos de:

50

midiendo (103) la tensión de la membrana (V_m) del miocito (90);

calculando (106) un valor de una corriente rectificadora interna (I_{K1}) basado en la tensión de la membrana del miocito (90); y

55

aplicando (109) una corriente rectificadora interna sintética al miocito (90) según el valor calculado (106) de la corriente rectificadora interna, para producir potenciales de acción habiendo mejorado la morfología.

10. El procedimiento (100) de la reivindicación 9, donde se determina el valor de la corriente rectificadora interna (106) según la ecuación:

60

$$I_{K1} = 0,5 \left(\frac{V_m + 85}{1 + e^{0,0896(V_m + 85)}} \right) + 0,01(V_m + 85).$$

11. El procedimiento (100) de la reivindicación 9, que comprende además la etapa de registro de la tensión de la membrana a lo largo del tiempo como potencial de acción del miocito (90).

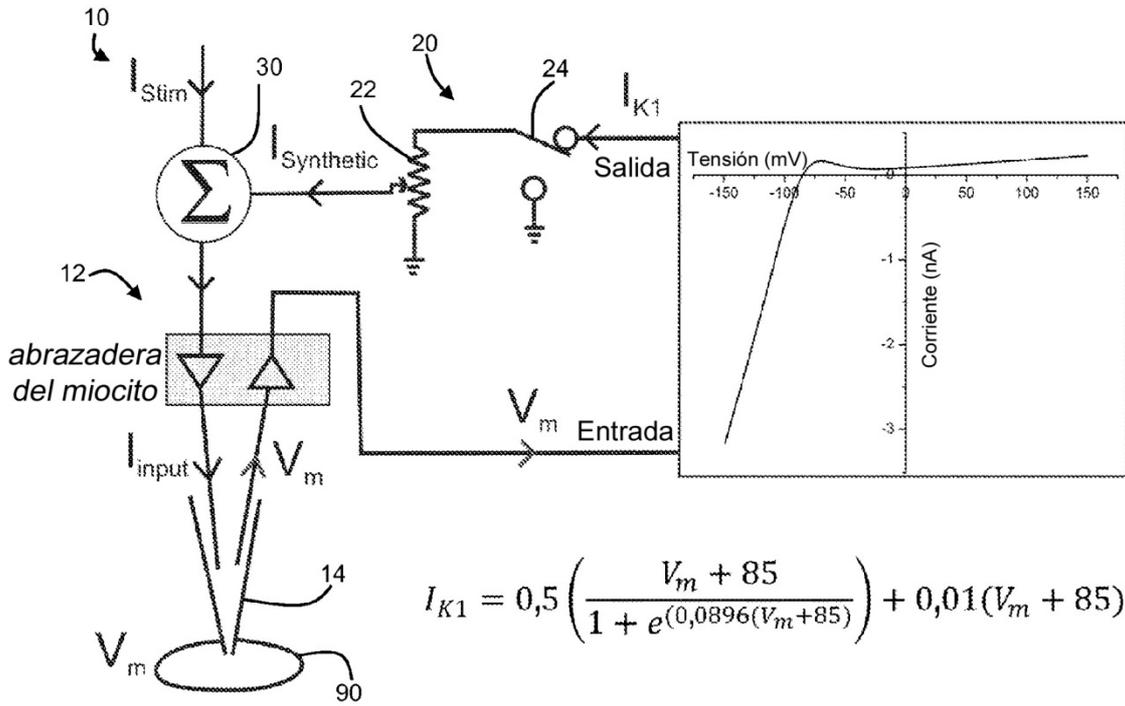


Fig. 1

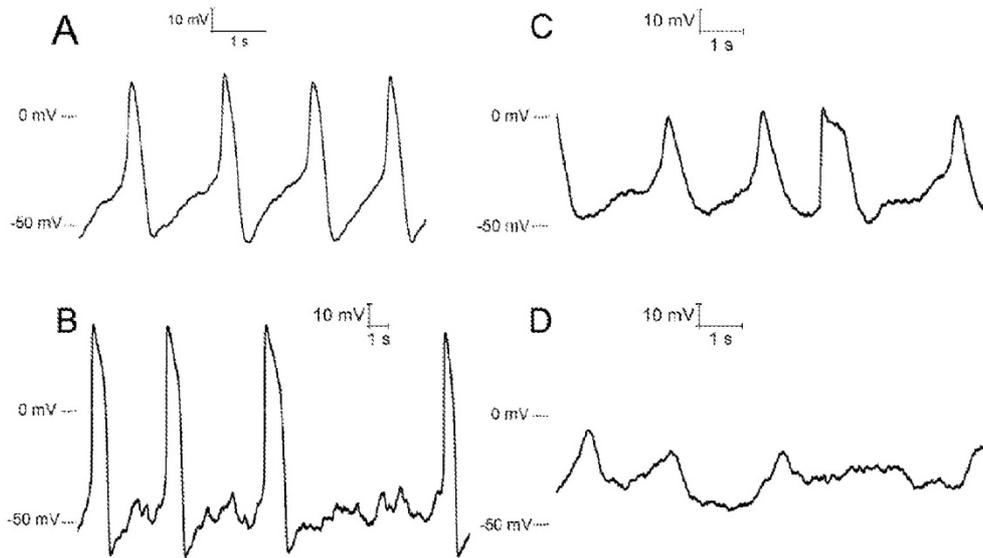


Fig. 2

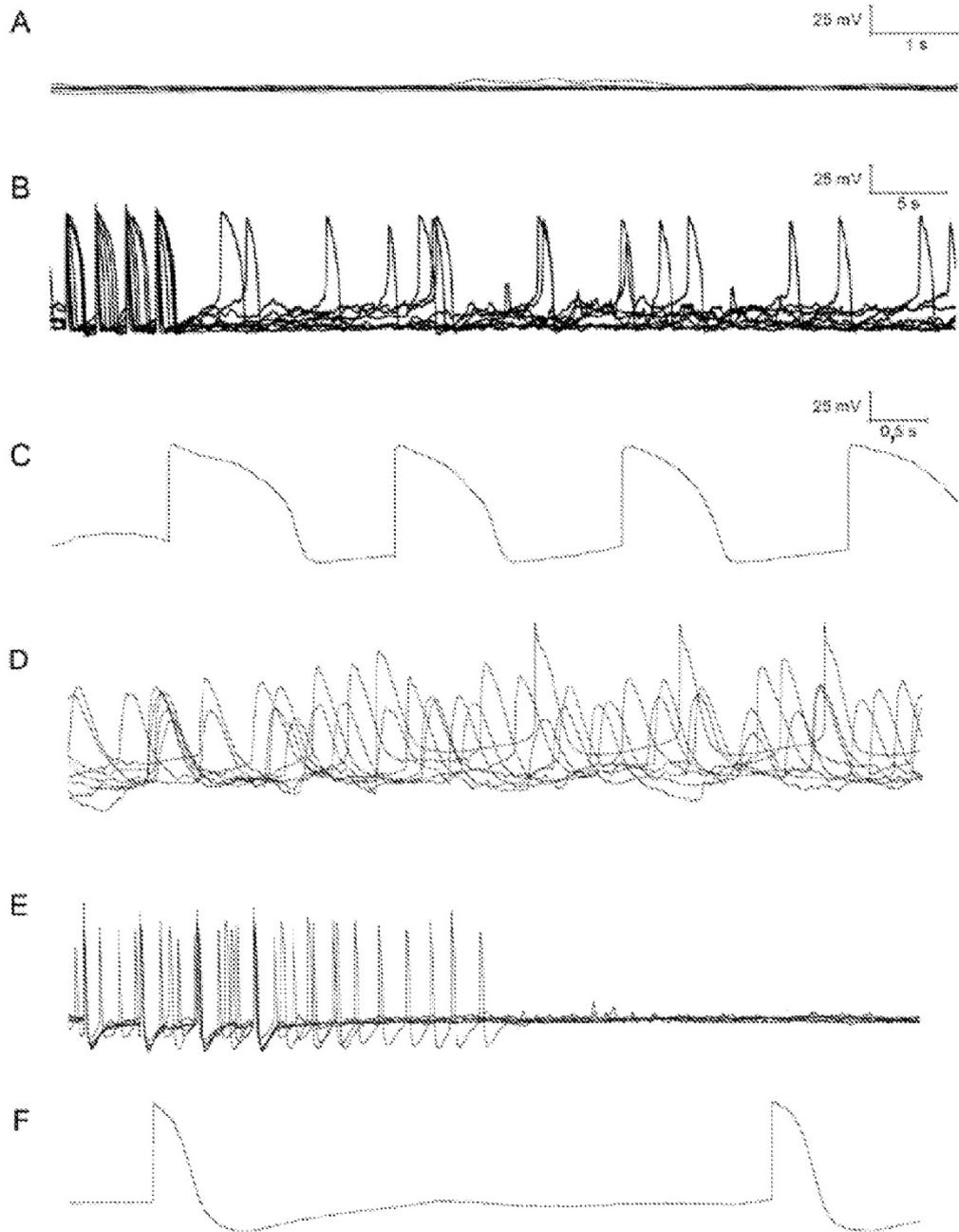


Fig. 3

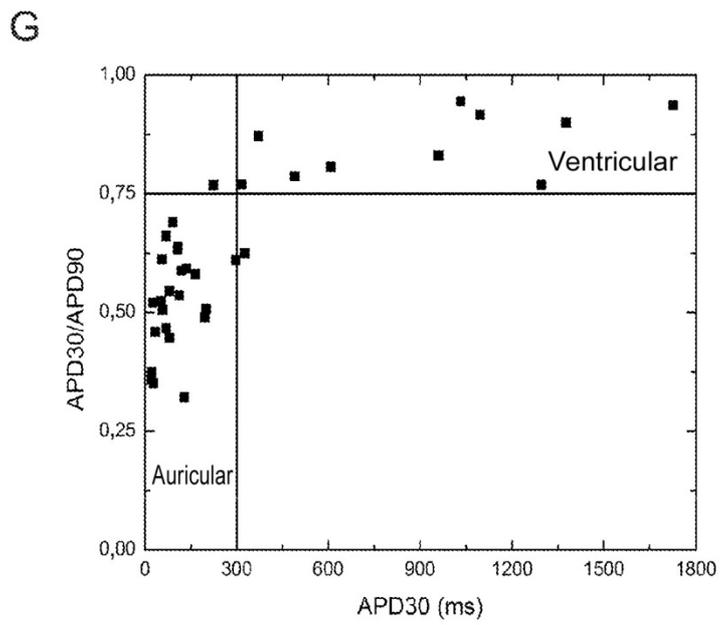
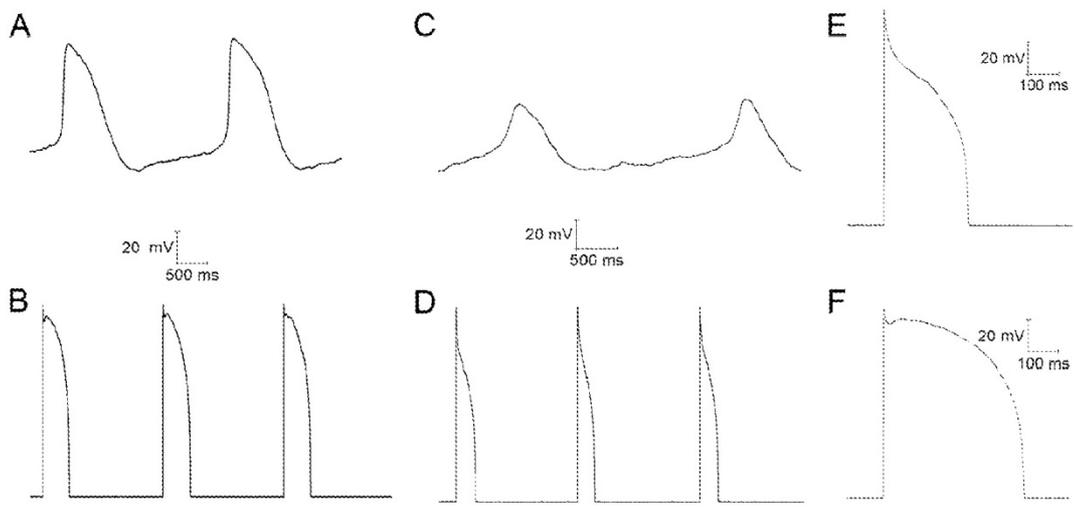


Fig. 4

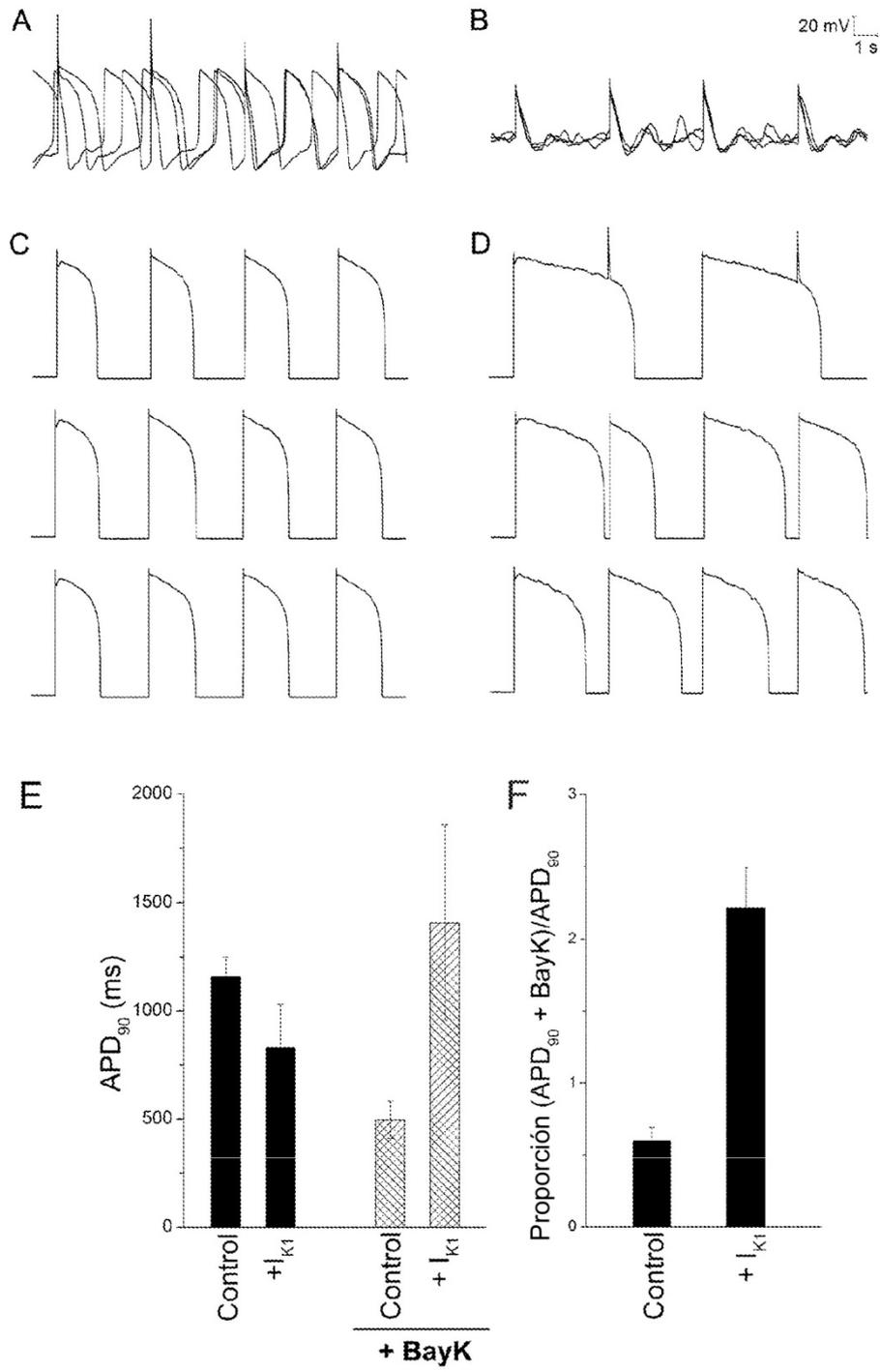


Fig. 5

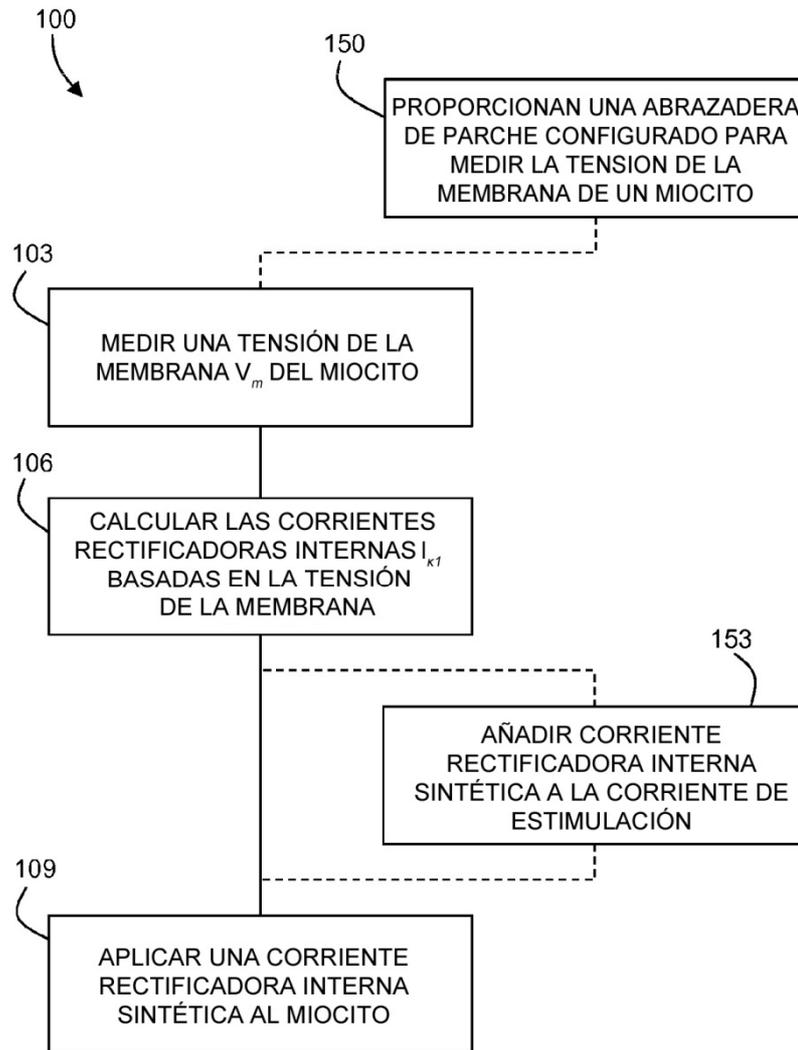


Fig. 6

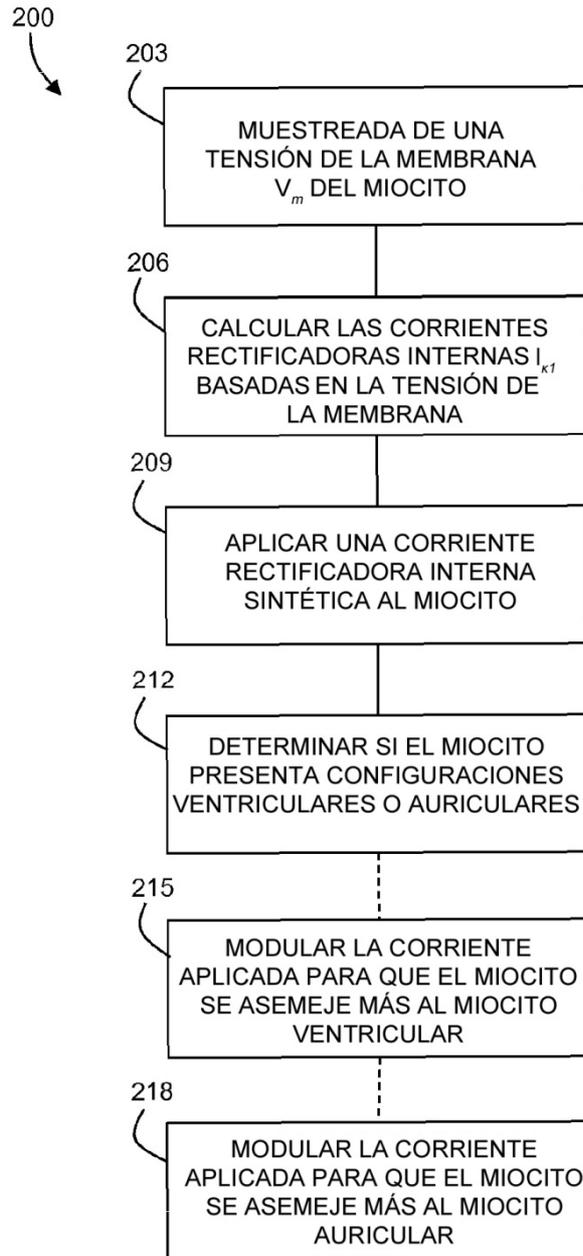


Fig. 7

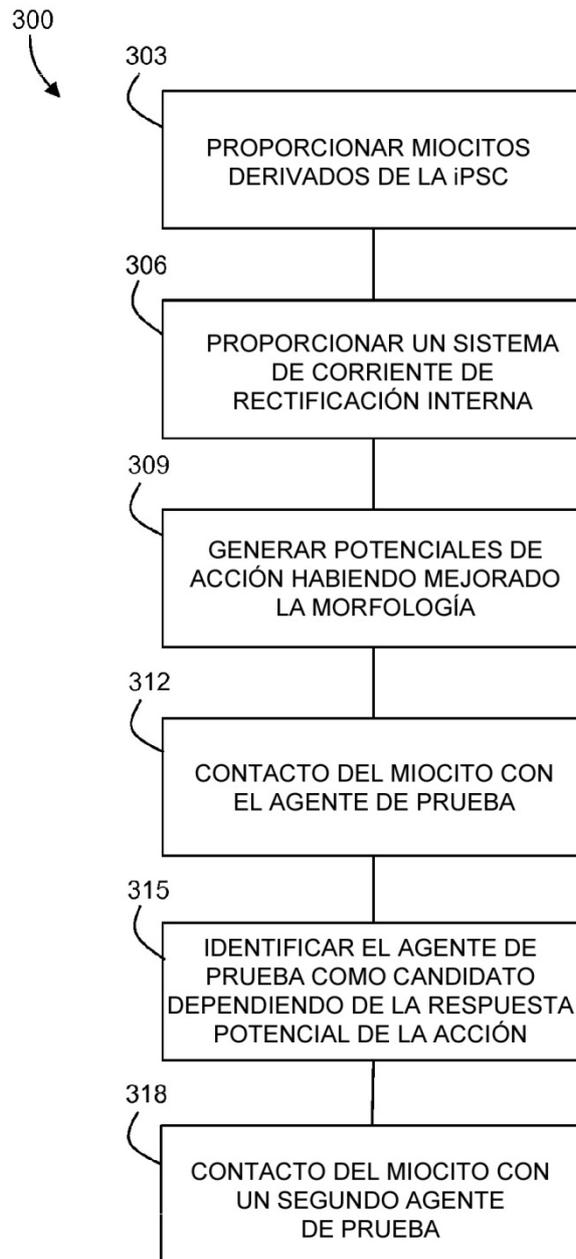


Fig. 8