

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 444**

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

C12Q 1/6876 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2014 PCT/IB2014/002289**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015 WO15004539**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2014 E 14805655 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 3017038**

54 Título: **Diferenciación de células madre pluripotentes y células progenitoras cardíacas en fibras de cardiomiocito estriadas usando laminianas LN-15, LN-521 y LN-221**

30 Prioridad:

02.07.2013 US 201361842241 P

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

14.02.2020

73 Titular/es:

**NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE (50.0%)
21 Lower Kent Ridge Road
Singapore 119077, SG y
BIOLAMINA AB (100.0%)**

72 Inventor/es:

**TRYGGVASON, KARL;
YAP, YAN, WEN;
YI, SUN y
TRYGGVASON, KRISTIAN**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 742 444 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

Diferenciación de células madre pluripotentes y células progenitoras cardíacas en fibras de cardiomiocito estriadas usando lamininas LN-15, LN-521 y LN-221

5 **Antecedentes**

Esta solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud de patente provisional estadounidense con n.º de serie 61/842.241, presentada el 2 de julio de 2.013.

10 La presente divulgación se refiere a métodos para generar células progenitoras de cardiomiocitos y cardiomiocitos a partir de células madre pluripotentes usando sustratos de lamininas. Encuentra aplicación particular en la diferenciación de cardiomiocitos a partir de células madre pluripotentes usando (1) laminina-521 o laminina-511 y (2) laminina-221. El método permite una generación controlable de células progenitoras de cardiomiocitos y cardiomiocitos diferenciados para diversas aplicaciones incluyendo cardiología regenerativa y realización de pruebas sobre efectos de fármacos y cardiotoxicidad.

15 Una célula madre es una célula no diferenciada de la que se derivan posteriormente células especializadas. Los ejemplos de células madre en el cuerpo humano incluyen células madre pluripotentes, células madre embrionarias, células madre adultas, células madre fetales y células madre amnióticas. Las células madre embrionarias poseen capacidad de autorrenovación considerable y pluripotencia con el potencial para diferenciarse en células de las tres capas germinales. Además, las células madre pluripotentes inducidas (iPS) generadas a partir de células diferenciadas con la ayuda de los factores de transcripción específicos son también pluripotentes.

20 Totipotencia se refiere a una célula que tiene la capacidad de diferenciarse en cualquier célula del cuerpo, incluyendo tejido extraembrionario. Pluripotencia se refiere a una célula que tiene el potencial para diferenciarse en células de las tres capas germinales. Sin embargo, al contrario de una célula totipotente las células pluripotentes no pueden formar tejido extraembrionario. Multipotencia se refiere a una célula que puede diferenciarse en células de linaje limitado. Por ejemplo, una célula madre hematopoyética puede diferenciarse en varios tipos de células de la sangre, pero no puede diferenciarse en una célula cerebral.

25 El proceso mediante el cual una célula madre se transforma en a una célula más especializada se denomina diferenciación. Por ejemplo, algunas células diferenciadas incluyen cardiomiocitos cardíacos, que se derivan de células madre embrionarias pluripotentes humanas (hESC). El proceso mediante el cual una célula especializada revierte a una célula de grado superior de potencia (es decir a una fase de desarrollo más temprana) se denomina desdiferenciación. En particular, células en un cultivo celular pueden perder propiedades que tenían originalmente, tales como forma o expresión de proteínas, después de sufrir el proceso de desdiferenciación. Un cardiomiocito diferenciado, por ejemplo, puede perder su fenotipo celular, sus características especializadas o su capacidad de transplantarse a la región cardíaca después del proceso de desdiferenciación.

30 La medicina regenerativa basada en terapia celular que usa células diferenciadas es prometedora como tratamiento para una variedad de lesiones tisulares. Los ejemplos de dianas de enfermedad potenciales para terapia celular incluyen lesiones cardíacas (por ejemplo infarto de miocardio), diabetes de tipo I (destrucción de células beta productoras de insulina) y enfermedad de Parkinson (falta de neuronas que producen dopamina). Un requisito previo para generar células para tal terapia es una posibilidad para diferenciar las células en tipos celulares específicos con protocolos reproducibles definidos y obtener grandes cantidades de células humanas con fenotipos celulares diferenciados estables que son adecuados para trasplante al sitio de lesión.

35 Existe también una necesidad urgente en la industria farmacéutica global de ensayos celulares nuevos, innovadores y predictivos para humanos, dado que problemas del descubrimiento de fármacos, tales como toxicidad y falta de eficacia, son causas principales de fallo/desgaste de fármacos durante la fase preclínica así como durante la fase clínica. Los sistemas celulares usados actualmente no son suficientes debido a varias limitaciones. Una limitación significativa es que las células diferenciadas se desdiferencian a menudo en cultivos celulares *in vitro*. Además, muchos tipos de células primarias humanas necesarias para el descubrimiento de fármacos, tales como cardiomiocitos y células neuronales, son por diversas razones casi inaccesibles.

Breve descripción

40 La presente invención se define mediante las reivindicaciones. La presente divulgación se refiere al desarrollo y la expansión de células progenitoras cardíacas y cardiomiocitos maduros manteniendo células madre en una combinación de laminina LN-521 o LN-511 embrionaria, junto con la laminina más abundante y altamente específica para el músculo cardíaco, LN-221. Este nuevo tipo de protocolo de diferenciación proporciona condiciones completamente libres de reactivos de animales y químicamente definidas que son un requisito previo para el uso de tales células para el desarrollo farmacéutico o como el uso directo en terapias celulares humanas. En el presente documento se divulgan métodos para generar células progenitoras de cardiomiocitos y cardiomiocitos maduros a través de diferenciación de células madre pluripotentes en sustratos de cultivo celular incluyendo lamininas

particulares.

5 En algunas realizaciones, los métodos para diferenciar cardiomiocitos a partir de una célula madre pluripotente comprenden mantener una célula madre pluripotente sobre un sustrato de cultivo celular que incluye LN-521 o LN-511, sembrar la célula madre pluripotente sobre un sustrato que incluye (i) LN-521 o LN-511 y (ii) LN-221, y cultivar las células madre pluripotentes en un medio basal para formar células progenitoras de cardiomiocitos. El medio basal no contiene ningún inhibidor de apoptosis.

10 Los métodos pueden incluir diferenciar las células progenitoras de cardiomiocitos en el sustrato para formar cardiomiocitos maduros.

Los métodos también pueden incluir cultivar las células madre pluripotentes en presencia de un inhibidor de GSK-3 para estimular la señalización de Wnt.

15 Los métodos pueden incluir cultivar las células madre pluripotentes en el medio basal desprovisto de inhibidores.

Los métodos también pueden incluir transformar los cardiomiocitos maduros en fibras musculares agregadas contráctiles (latientes).

20 Los métodos pueden incluir agrupar las células madre pluripotentes en presencia de inhibidor de Wnt para suprimir la señalización de Wnt.

Los métodos también pueden incluir un recubrimiento de cultivo celular donde al menos una de LN-521, LN-511 y LN-221 es una laminina recombinante efectiva.

25 Los métodos pueden incluir un sustrato de cultivo celular y sustrato de combinación de cultivo celular sin inhibidores de diferenciación, células nutrientes, inductores de diferenciación o inhibidores de apoptosis.

30 Los métodos pueden incluir además aplicar un medio de cultivo celular a las células madre pluripotentes.

Los métodos también pueden incluir células progenitoras de cardiomiocitos que expresan islote-1, NKX2.5, así como otros factores de transcripción.

35 Los métodos pueden incluir además las fibras musculares agregadas y las láminas de células latientes que expresan los biomarcadores de filamento de sarcómero de miosina (MF-20), cadena ligera de miosina para las células ventriculares (MLC2v) y troponina T.

40 Se divulga además pero no está dentro del alcance de las reivindicaciones una célula progenitora de cardiomiocitos que se forma a partir de la diferenciación de células madre pluripotentes en un sustrato de combinación de cultivo celular que incluye al menos una de (i) LN-511 y LN-521, y (ii) LN-221.

La célula progenitora de cardiomiocitos puede expresar factor de transcripción NKX2.5 y islote-1.

45 Se divulga además pero no está dentro del alcance de las reivindicaciones un cardiomiocito maduro que se forma a partir de la diferenciación de células madre pluripotentes en un sustrato de combinación de cultivo celular que incluye al menos una de LN-511 y LN-521, y LN-221.

50 El cardiomiocito maduro puede formar una fibra muscular o una lámina de células latiente que expresa los biomarcadores de filamento de sarcómero de miosina (MF-20), cadena ligera de miosina para las células ventriculares (MLC2v) y troponina T.

La fibra muscular puede tener un fenotipo estriado latiente.

55 Se divulgan además pero no están dentro del alcance de las reivindicaciones métodos para formar una fibra muscular cardíaca con un fenotipo estriado latiente los cuales pueden incluir diferenciar células madre pluripotentes en un sustrato que incluye (i) LN-521 o LN-511 y (ii) LN-221, para formar cardiomiocitos maduros, y transformar los cardiomiocitos maduros en una fibra muscular cardíaca similar a los cardiomiocitos que tiene un fenotipo estriado latiente.

60 En algunos métodos, la célula madre pluripotente es una célula madre embrionaria humana (hESC). Una fibra muscular cardíaca que tiene un fenotipo estriado latiente puede generarse mediante la diferenciación de células madre pluripotentes en un sustrato de combinación de cultivo celular que incluye (i) LN-521 o LN-511 y (ii) LN-221.

65 La fibra muscular cardíaca puede generarse mediante la diferenciación de una célula madre embrionaria humana (hESC).

Se divulgan también en el presente documento las células y fibras musculares creadas usando los métodos descritos en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

5 El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. La oficina proporcionará las copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujo(s) en color previa petición y pago de la tasa necesaria.

10 Lo siguiente es una breve descripción de los dibujos, los cuales se presentan con el fin de ilustrar las realizaciones a modo de ejemplo divulgadas en el presente documento.

15 La figura 1 es una imagen de microscopía electrónica de sombreado rotatorio de una molécula individual de laminina recombinante que contiene las cadenas α , β y γ . Revela tres brazos cortos con dominios globulares pequeños y un brazo largo con un dominio globular grande en el extremo terminal.

20 La figura 2(A) es un dibujo de los motivos estructurales de las cadenas $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$ y $\gamma 1$ de laminina. Cada cadena de laminina contiene alineamientos en tándem de dominios globulares y similares a varillas. La figura 2(B) es un dibujo de las cadenas α , β y γ de laminina ensamblándose para formar un helicoide enrollado en al menos 16 combinaciones. En el presente documento se ilustran las lamininas triméricas LN-221 y LN-511 y LN-521.

25 La figura 3 incluye diagramas de flujo que ilustran métodos de diferenciar cardiomiocitos a partir de células madre pluripotentes. La figura 3(A) incluye un sumario de alto nivel de etapas de método según una realización de diferenciación de células hES en cardiomiocitos latientes que incluye una indicación de cuáles marcadores de pluripotencia deben expresarse en los diferentes días. La figura 3(B) incluye una ilustración día a día de etapas que corresponden con un método de diferenciación de células madre pluripotentes en cardiomiocitos latientes. La figura 3(C) incluye una ilustración detallada de etapas de método según otra realización de diferenciación de cardiomiocitos.

30 La figura 4 incluye microfotografías y análisis por citometría de flujo de células progenitoras cardiacas. La figura 4(A) detalla la expresión de DAPI para los núcleos. La figura 4(B) detalla el factor de transcripción islote-1 (rojo). La figura 4(C) detalla una combinación de la expresión de DAPI y el factor de transcripción islote-1 en células progenitoras de cardiomiocitos derivadas de hESC. La figura 4(D) detalla la expresión de DAPI para los núcleos. La figura 4(E) detalla el factor de transcripción NKX2.5 y la figura 4(F) detalla una combinación de la expresión de DAPI y el factor de transcripción NKX2.5 en células progenitoras de cardiomiocitos derivadas de hESC. Las figuras 4(A-F) muestran que la expresión de islote-1 y NKX2.5 se localiza en el núcleo de las células, lo que sugiere fuertemente la presencia de células progenitoras de cardiomiocitos.

40 La figura 5 incluye un análisis de células progenitoras cardiacas. Las células se analizaron con anticuerpos contra islote-1 y contra NKX2.5. La figura 5A es el análisis por el fenotipo, en el que se formaron colonias definidas cuando las células se mantuvieron en LN-521. La figura 5B es un análisis por citometría de flujo. Las medidas de NKX2.5 se marcan con triángulos, las medidas de islote-1 se marcan con rombos y el control de isotipo se marca con círculos. En la figura 5C, las células progenitoras analizadas con anticuerpos contra islote-1 y contra NKX2.5 mostraron positividad de >99% para ambos marcadores. Las mediciones de NKX2.5 se marcan con círculos, las mediciones de islote-1 se marcan con triángulos y el control de isotipo se marca con rombos. En ambos gráficos, el eje y es el número de células que expresan un nivel determinado de APC-A, que se indica en el eje x.

50 La figura 6(A) y la figura 6(B) son microfotografías de fibras musculares cardiacas humanas similares a cardiomiocitos alineadas entre sí a lo largo para formar las miofibrillas. La figura 6(C) es una imagen de cardiomiocitos individuales que tienen morfología rectangular.

55 La figura 7 incluye microfotografías que muestran la expresión, en el cardiomiocito de la figura 6(B), de biomarcadores troponina T cardiaca (cTNT) (verde) figura 7(A), troponina I cardiaca (cTNI) (verde) figura 7(B), cadena ligera de miosina para células ventriculares (MLC2v) (verde) figura 7(C) y alfa-actinina (α -actinina) (verde) figura 7(D). Se observó la organización de sarcómeros alineados a partir de estas tinciones. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

60 La figura 8 muestra análisis por citometría de flujo de cardiomiocitos en el día 30. La figura 8A muestra el análisis para la troponina T cardiaca T (cTNT). La figura 8B muestra el análisis para la proteína sarcomérica miosina cardiaca (MF20). En estos dos gráficos, el eje y es el número de células que expresan un nivel determinado de la proteína (indicada en el eje x). La línea indicada mediante círculos es para la proteína, mientras que la línea indicada por rombos es el control de isotipo. En la figura 8A, el 82,2% de las células son positivas para cTNT, y el 17,8% de las células son negativas para cTNT. En la figura 8B, el 86,8% de las células son positivas para MF20. Ambos análisis fueron >80% positivos. La figura 8C muestra análisis electrofisiológico mediante pinzamiento zonal que registra el potencial de acción revelado de los 3 subtipos de cardiomiocitos en el corazón, concretamente las células similares a las ventriculares, las células similares a las nodales y las células similares a las auriculares.

La figura 9 incluye un análisis de transcriptoma detallado de los días de diferenciación 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 20 y 30. La figura 9A muestra la expresión disminuida de genes pluripotentes a niveles insignificantes después de 30 días. La figura 9B muestra la expresión temporal de genes específicos de células progenitoras indicativa de la especificación de linaje mesodérmico y de la especialización de los cardiomiocitos. La figura 9C muestra la expresión aumentada de los genes específicos de los cardiomiocitos después del día 9.

Descripción detallada

Se puede obtener una comprensión más completa de las composiciones y métodos divulgados en el presente documento mediante referencia a los dibujos adjuntos. Estas figuras son simplemente representaciones esquemáticas basándose en la conveniencia y la facilidad de demostrar la presente divulgación.

Aunque se usan términos específicos en la siguiente descripción para mayor claridad, se desea que estos términos se refieran sólo a la estructura particular de las realizaciones seleccionadas para la ilustración en los dibujos. En los dibujos y la siguiente descripción a continuación, se entenderá que designaciones numéricas similares se refieren a componentes de función similar.

Los métodos de la presente divulgación se refieren al mantenimiento del fenotipo de células diferenciadas. En este caso, el término "fenotipo" se refiere a las características y propiedades observables de la célula. Estas incluyen cosas tales como la morfología, las propiedades bioquímicas o fisiológicas de la célula, etc. Es deseable mantener el fenotipo de la célula, particularmente cuando las células se van a usar para terapia celular o realización de pruebas farmacológicas o toxicológicas.

Debido a sus propiedades únicas para renovar indefinidamente y a su capacidad para formar todos los derivados somáticos del cuerpo humano, las células madre pluripotentes humanas (hPSC) tienen un enorme potencial para su uso en medicina regenerativa. Las células HiPS pueden encontrar también aplicaciones en terapia celular, pero también como sistemas modelo para estudiar aspectos de enfermedades genéticas humanas si las células iPS se generan a partir de individuos con una enfermedad genética. Otra perspectiva interesante de las hPSC es su uso en el descubrimiento de fármacos *in vitro* donde generan amplio interés para investigación farmacéutica, englobando desde los estudios tempranos de dianas hasta los estudios del metabolismo de fármacos y farmacocinéticos o la evaluación de seguridad. Se necesitan urgentemente ensayo *in vitro* basados en células con alta relevancia humana para actividades pre-clínicas.

Los sistemas de células humanas usados actualmente están estorbados por el hecho de que las células o líneas celulares primarias disponibles o bien pierden rápidamente sus funciones específicas, o bien ya carecen de estas propiedades. Además, muchos tipos de células primarias humanas, como los cardiomiocitos, son prácticamente inaccesibles para la terapia celular de daño tisular como infarto de miocardio, diabetes de tipo I y enfermedad de Parkinson, o la realización de pruebas de fármacos y de toxicidad. Las hPSC diferenciadas en el progenitor funcional de células totalmente diferenciadas pueden proporcionar un suministro virtualmente ilimitado de material celular humano homogéneo necesario en investigación y desarrollo farmacéutico, que facilita en gran medida actividades de cribado más extensas tales como estudios comparativos o la realización de pruebas de compuestos de alto rendimiento. Además, la diversidad genética y la variabilidad humana pueden abordarse fácilmente ya que las células especializadas pueden derivarse de múltiples líneas de hESC.

La explotación plena del potencial de las hPSC en estas áreas se ha visto limitada durante mucho tiempo por varios obstáculos técnicos importantes: (1) el cultivo de hPSC sin pérdida de pluripotencia ha sido problemático; (2) el cultivo de hPSC era hasta hace poco imposible sin el respaldo de células nutrientes o diversos complementos animales; (3) la estabilidad genética sin la introducción de cambios cromosómicos ha requerido hasta ahora el "paso manual" de colonias de hPSC, limitando severamente la adaptabilidad del cultivo; (4) la derivación de linajes de células diferenciadas específicas relevantes para tratamientos terapéuticos, modelización de enfermedad o investigación farmacéutica ha sido extremadamente ineficaz, y; (5) las células diferenciadas a partir de derivados de hPSC son la mayoría de las veces inmaduras y no corresponden adecuadamente a las células diferenciadas en el tejido u órgano receptor después del trasplante. Estos obstáculos técnicos pueden abordarse usando sustratos de laminina relevantes biológicamente particulares y/o tomando otras medidas durante la generación de células diferenciadas.

Las células diferenciadas requieren dos cosas para sobrevivir y reproducirse: (1) un sustrato o recubrimiento que proporciona a la célula un soporte estructural y señales hacia a dentro (*outside-in*); y (2) un medio de cultivo celular para proporcionar a la célula nutrición, factores de crecimiento y hormonas. El sustrato o recubrimiento (1) se sitúa generalmente, por ejemplo, en la superficie de una placa de Petri, placa de microtitulación o algún otro recipiente. Se contempla particularmente que el sustrato de cultivo celular en el que se siembra en placa la célula diferenciada comprende una laminina.

Las lamininas son una gran familia de glicoproteínas heterotriméricas que residen principalmente en la lámina basal inmediatamente adyacente a la membrana celular. Funcionan, por un lado, mediante interacciones de unión con

receptores de células vecinas, y por otro lado mediante unión a otras moléculas de laminina u otras proteínas de la matriz tales como otras lamininas, colágenos, nidógenos o proteoglicanos. Las moléculas de laminina tienen varios subdominios en diferentes regiones de la molécula que se unen a receptores celulares y otras moléculas en la matriz extracelular. Las moléculas de laminina son moléculas de señalización importantes que pueden influir fuertemente en el comportamiento y la función celulares por medio de unión a receptores de señalización. Las lamininas son importantes tanto en el mantenimiento del fenotipo de células/tejidos, así como en la promoción del crecimiento, diferenciación, adhesión y migración celulares en la reparación y el desarrollo tisulares.

Las lamininas son proteínas grandes, de varios dominios, con una organización estructural común. La molécula de laminina integra diversas funciones interactivas de la matriz y de la célula en una molécula.

Una molécula de proteína laminina comprende una subunidad de cadena α , una subunidad de cadena β y una subunidad de cadena γ , unidas todas entre sí para formar un trímero a través de un dominio de helicoide enrollado (1). La figura 1 representa la estructura resultante de la molécula de laminina. Las doce cadenas de subunidades de laminina conocidas pueden formar al menos 16 tipos de laminina trimérica en tejidos nativos. Dentro de las estructuras de laminina trimérica son identificables dominios que poseen actividad de unión para otras moléculas de laminina y de lámina basal, así como receptores unidos a membrana.

La figura 2A muestra las tres subunidades de cadenas de laminina (cadena alfa-5, cadena alfa-2, cadena beta-1, cadena beta-2 y gamma-1), por separado. Por ejemplo, los dominios VI, IVb y IVa forman estructuras globulares, y los dominios V, IIIb y IIIa (que contienen elementos similares a EGF ricos en cisteína) forman estructuras similares a varillas. Los dominios I y II de las tres cadenas participan en la formación de una estructura de helicoide enrollado tricateneria (el brazo largo).

Con referencia continua a la figura 2A, cada cadena de laminina contiene alineamientos en tándem de dominios globulares y similares a varillas. Las cadenas α tienen cinco subdominios o motivos globulares (LG 1-5) en el extremo C-terminal. En $\alpha 2$ y $\alpha 5$, se cree que los LG 4-5 normalmente se escinden extracelularmente, mientras que todos los motivos LG probablemente están intactos en las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ funcionales. El dominio LG es la región principal de unión a receptores de la célula, pero otros dominios pueden interactuar también con receptores de la célula. Los dominios LG 1-3 se unen a integrinas, mientras que los LG 4 y LG 5 contienen sitios de unión para el distroglicano (DG) y glicolípidos sulfatados (SGL). Un motivo globular pequeño ($L\beta$) en el dominio de helicoide enrollado de las cadenas β se une a agrina. El extremo N-terminal de todas las cadenas contiene una cantidad variable de repeticiones similares a EGF en dominios cortos similares a varillas ($LEa-c$), así como 1-3 dominios globulares ($L-N$, $L4$, $L4a$, $L4b$, LFx).

Existen cinco cadenas alfa diferentes, cuatro cadenas beta y tres cadenas gamma que se han encontrado en tejidos humanos en al menos quince combinaciones diferentes (1). Estas moléculas (isoformas) se nombraron previamente como laminina-1, laminina-2, etc. según su orden de descubrimiento, pero actualmente se nombran según su composición de cadena, por ejemplo laminina-111 (laminina-1) que contiene cadenas alfa-1, beta-1 y gamma-1. Se han identificado cuatro grupos familiares de lamininas estructuralmente definidos. El primer grupo de cinco moléculas de laminina identificadas comparten todas las cadenas $\beta 1$ y $\gamma 1$, y varían en su composición de la cadena α (cadenas $\alpha 1$ a $\alpha 5$). El segundo grupo de cinco moléculas de laminina identificadas, que incluyen la laminina-521, comparten todas las cadenas $\beta 2$ y $\gamma 1$, y de nuevo varían en su composición de la cadena α . El tercer grupo de moléculas de laminina identificadas tiene un miembro identificado, laminina-332, con una composición de cadenas de $\alpha 3\beta 3\gamma 2$. El cuarto grupo de moléculas de laminina identificadas tiene un miembro identificado, laminina-213, con la cadena $\gamma 3$ recién identificada ($\alpha 2\beta 1\gamma 3$).

La laminina es (i) LN-521 o LN-511 en combinación con (ii) LN-221.

El término "laminina-521" se refiere a la proteína formada uniendo entre sí las cadenas $\alpha 5$, $\beta 2$ y $\gamma 1$. El término "laminina-511" se refiere a la proteína formada uniendo entre sí las cadenas $\alpha 5$, $\beta 1$ y $\gamma 1$. El término "laminina-221" se refiere a la proteína formada uniendo entre sí las cadenas $\alpha 2$, $\beta 2$ y $\gamma 1$. Estos términos deben interpretarse como que abarcan tanto la laminina recombinante como la laminina heterotrimérica a partir de fuentes que se producen de manera natural. El término "recombinante" indica que la proteína se produce artificialmente usando plásmidos de expresión en células que normalmente no expresan tales proteínas.

La laminina puede ser una proteína intacta o un fragmento de proteína. El término "intacta" se refiere a la proteína que está compuesta de todos los dominios de la cadena α , la cadena β y la cadena γ , con las tres cadenas uniéndose entre sí para formar la estructura heterotrimérica. La proteína no se descompone en cadenas, fragmentos o dominios funcionales separados. El término "cadena" se refiere a la totalidad de la cadena alfa, beta o gamma de la proteína laminina. El término "fragmento" se refiere a cualquier fragmento de proteína que contiene uno, dos o tres dominios funcionales que poseen actividad de unión a otra molécula o receptor. Sin embargo, una cadena no debe considerarse un fragmento debido a que cada cadena posee más de tres tales dominios. De forma similar, una proteína de laminina intacta no debe considerarse un fragmento. Los ejemplos de dominios funcionales incluyen dominios I, II, III, IV, V, VI y el dominio G. Se encuentra información adicional de estos dominios en Domogatskaya,

A., Rodin, S., y Tryggvason, K. 2012. Functional diversity of laminins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28:523-553.

Las lamininas pueden formar teóricamente más de 50 combinaciones diferentes, pero se han identificado al menos 16 en mamíferos. Las lamininas son importantes para la diferenciación celular en el embrión, son moléculas de unión a la célula principales, son importantes para la migración celular y definidas y libres de materiales extraños y se ha demostrado que proporcionan un ambiente biológico *in vitro* relevante.

Con referencia a la figura 2(B), la laminina y las cadenas α , β y γ se ensamblan para formar un helicoide enrollado en al menos 16 combinaciones. En este caso, se ilustran las lamininas triméricas LN-221 y LN-511 y LN-521. Se encuentra información adicional sobre LN-211, LN-511 y LN-521 en Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W.G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E., Jones, J.C., *et al.* 2005. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 24:326-332.

Diferentes lamininas son importantes para diferentes tipos celulares, tanto para su formación como para el mantenimiento de su fenotipo. Por ejemplo, LN-521 y LN-511 respaldan el mantenimiento y la propagación eficaces, a largo plazo, de hPSC y hiPSC sin un riesgo de diferenciación espontánea o cambios genéticos. Se encuentra información adicional sobre LN-521 y LN-511 en Rodin, S., Domogatskaya, A., Strom, S., Hansson, E.M., Chien, K.R., Inzunza, J., Hovatta, O., y Tryggvason, K. 2010. Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on human recombinant laminin-511. *Nat Biotechnol* 28:611-615, y Rodin, S. *et al* en *Nat Commun*, 27 de enero, 2014. La LN-521 junto con E-cadherina como una matriz facilita la derivación clonal de células hES desde un embrión fertilizado *in vitro* sin necesidad de destruir el embrión. Véase Rodin, S. *et al.* *Nat Commun*, 27 de enero de 2014.

Las LN-211 y LN-221 son altamente específicas para fibras (células) del músculo cardíaco y esquelético, y tienen también papeles importantes en el sistema nervioso. Sin embargo, la LN-221 es la isoforma de laminina más abundante en el músculo cardíaco humano, siendo aproximadamente 3 veces más abundante que la LN-211 basándose en el análisis del transcriptoma global del ventrículo del corazón. Las otras lamininas más comunes presentes en el músculo cardíaco son LN-511 y LN-521.

Las células progenitoras de las células musculares cardíacas (cardiomiocitos) y los cardiomiocitos maduros son de crítica importancia para el desarrollo de la terapia celular de lesión del músculo cardíaco. Aunque las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en cardiomiocitos cultivándolas en sustratos de la matriz extracelular tales como Matrigel™ murino, o en células nutrientes tales como fibroblastos humanos o de ratón, diferenciación del cuerpo embrionario (EB) tridimensional o co-cultivo inductivo con células END2 en presencia de condiciones de diferenciación, estos métodos no están definidos químicamente y sus resultados varían de un experimento a otro. Existe una falta de reproducibilidad, existe una necesidad de inclusión de suero, tamaños de EB heterogéneos y/o la utilización de una matriz compleja Matrigel™ que es un extracto tumoral que contiene varias proteínas de membrana basal (por ejemplo colágeno de tipo IV, perlecan, laminina) así como factores de crecimiento y proteínas intracelulares. De forma adicional, la laminina presente en Matrigel es LN-111, que apenas existe en el músculo cardíaco normal. Matrigel™ es el recubrimiento de cultivo celular más usado para el mantenimiento de las células madre pluripotentes y también el sustrato preferido para la diferenciación celular cuando se usa para volver a sembrar en placa EB y para diferenciación en monocapa. Desafortunadamente, Matrigel™ se aísla de una matriz similar a membrana basal producida por un tejido de tumor de ratón completo (sarcoma EHS), y, por tanto, es xenogénico, afectado por variaciones entre los distintos lotes y contiene una cantidad considerable de componentes indefinidos. Además, las células cultivadas en Matrigel™ tienen también posibilidades de adquirir el inmunógeno ácido N-glicililneuramínico (Neu5Gc) no humano que hace que sean inadecuadas para aplicaciones clínicas.

Un estudio de Lian *et al.* demostró que las células madre pluripotentes son capaces de diferenciarse usando moléculas pequeñas que modulan la ruta de señalización de Wnt en una monocapa usando Matrigel™ y una placa comercial llamada Synthemax usando medios mTeSR1 con inhibidor de ROCK. El componente exacto de Synthemax está patentado por Corning®, sin embargo está basado en un estudio de Melkounian *et al.* Información adicional sobre el estudio de Melkounian se encuentra en Melkounian, Z., Weber, J.L., Weber, D.M., Fadeev, A.G., Zhou, Y., Dolley-Sonneville, P., Yang, J., Qiu, L., Priest, C.A., Shogbon, C., *et al.* 2010. Synthetic peptide-acrylate surfaces for long-term self-renewal and cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 28:606-610. Comunicó que la secuencia del péptido RGD sintético de la proteína vitronectina es suficiente para mantener células madre pluripotentes. Sin embargo, esta superficie no es un sustrato biológicamente relevante para ninguna célula en el cuerpo. Además, el medio usado (mTeSR1) contiene albúmina de suero bovino (BSA) y alta concentración de factor de crecimiento de FGF básico (100 ng/ml). Además de esto, sembró células individuales que requieren inhibidor de ROCK adicional para disminuir apoptosis inducida disociada. Todavía no se conoce el mecanismo real de cómo funciona este inhibidor para promover la supervivencia de células individuales. Por tanto, se desea la existencia de protocolos de diferenciación que proporcionen un ambiente completamente definido químicamente, controlable y libre de materiales extraños.

El corazón de los mamíferos neonatos es capaz de regeneración significativa del músculo cardíaco lesionado durante sólo aproximadamente una semana después del nacimiento. Después de eso, tiene lugar la detención del ciclo celular mediante mecanismos desconocidos y eso impide la proliferación de células cardíacas y la reparación tisular subsiguiente. El progreso reciente en investigación con células madre y el diseño de protocolos de

diferenciación nuevos ha abierto posibilidades de nuevos enfoques de terapia celular para el tratamiento de daño muscular cardiaco. Se han explorado varios tipos de células para propósitos de terapia celular, pero actualmente las fuentes más atractivas incluyen (i) células progenitoras de cardiomiocitos o células similares a cardiomiocitos derivadas o bien de hESC o bien de células madre pluripotentes inducidas (reprogramadas) (iPSC), (ii) 5 cardiomiocitos reprogramados directamente a partir de fibroblastos, o (iii) células progenitoras de cardiomiocitos aislados y expandidos a partir de tejido del músculo cardiaco embrionario o adulto. Las líneas celulares reprogramadas derivadas de fibroblastos humanos se han generado mediante administración de vectores que contienen ADNc para diversos factores de transcripción, los cuales pueden plantear un problema ya que implican cambios en el genoma. Una preocupación es que tales células pueden llegar a ser tumorigénicas y por tanto 10 puedan no ser adecuadas para terapia celular de enfermedad humana. Por tanto, sería deseable tener la capacidad de derivar células progenitoras cardiacas o cardiomiocitos maduros a partir de células madre embrionarias o mesenquimatosas pluripotentes o también a partir de células progenitoras del tejido de músculo cardiaco adulto.

El método para diferenciar una célula progenitora cardiaca humana o un cardiomiocito humano maduro a partir de 15 células madre pluripotentes incluye mantener las hESC en lamininas embrionarias LN-521 o LN-511 en presencia de laminina LN-221 que está presente en la membrana basal rodeando las células de fibras musculares. Las lamininas adecuadas incluyen isoformas de laminina específicas, por ejemplo LN-511, LN-512, LN-211 y LN-221, proporcionadas por BioLamina, AB, en Suecia.

En lo que se refiere a la figura 3A, se describe un sumario de alto nivel de las etapas del método según una 20 realización de diferenciación de células hES en cardiomiocitos latientes. El término "CHIR" se refiere a un inhibidor de glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) que imita preadipocitos de señalización de Wnt. El término "IWP" se refiere a un inhibidor de Wnt que sirve como un antagonista de la ruta Wnt/I-catenina. El término "Wnt" representa proteínas Wnt, que son moléculas de secreción altamente conservadas que regulan las interacciones entre células durante la embriogénesis. El acrónimo "rhLN" significa laminina recombinante humana.

En lo que se refiere a la figura 3B, se describe una ilustración día a día de etapas que corresponden con un método 25 de diferenciación de células madre pluripotentes en cardiomiocitos latientes.

En lo que se refiere a la figura 3C, comienza en S101 un método S100 para diferenciar cardiomiocitos a partir de 30 células madre pluripotentes usando sustratos de laminina según otra realización.

En S102, se mantienen células pluripotentes en laminina-521 (LN-521) o laminina-511 (LN-511) combinadas con LN- 35 221.

En S104, se siembran las células pluripotentes sobre un sustrato de combinación que incluye LN-521 o LN-511 y LN-221 y se mantienen durante cinco días.

En S106, se cultivan las células pluripotentes durante un día en presencia de un inhibidor de GSK-3 para inhibir la 40 fosforilación de β -catenina, lo que a su vez estimula la señalización de Wnt canónica. Los inhibidores de GSK-3 adecuados incluyen CHIR 99021 de Stemgent de Cambridge, MA, y otros inhibidores similares tal como conoce un experto habitual en la técnica.

En S108, se cultivan las células pluripotentes en un medio basal desprovisto de inhibidor durante dos días.

En S110, se cultivan células pluripotentes durante dos días con un inhibidor de Wnt para suprimir la señalización de 45 Wnt.

En S112, se cultivan las células durante 2 días en el medio basal donde forman células progenitoras de 50 cardiomiocitos. Estas hESC pueden expresar los factores de transcripción islote-1 y NKX2.5, que son biomarcadores para células progenitoras de cardiomiocitos. La expresión del factor de transcripción islote-1 se ilustra en la microfotografía de las figuras 4A-C. En lo que se refiere a la figura 4(A), una microfotografía de la expresión del factor de transcripción islote-1 muestra células progenitoras de cardiomiocitos derivadas de hESC. Las células se inmunotñieron en la figura 4A con DAPI para los núcleos, la figura 4B y la figura 4E para islote-1, NKX2-5 y la figura 55 4C y la figura 4F mostraron los resultados combinados. Los resultados muestran que islote-1 y NKX2-5 se localizan en el núcleo de las células, lo que demuestra claramente la presencia de células progenitoras cardiacas.

En lo que se refiere a la figura 5C, el análisis por citometría de flujo muestra que el 99% de las células están 60 expresando los biomarcadores de cardiomiocitos islote-1 y NKX2-5.

Haciendo referencia de nuevo a la figura 3(C), en S114, se diferencian adicionalmente las células progenitoras en el 65 sustrato de combinación para generar cardiomiocitos maduros.

En S116, se transforman los cardiomiocitos maduros en fibras musculares cardiacas humanas similares a 65 cardiomiocitos que se pueden alinear por parejas para formar miofibrillas, manteniendo el fenotipo estriado latiente. Las miofibrillas se ilustran en la figura 6A. En lo que se refiere a la figura 6(C), los cardiomiocitos individuales tienen

un fenotipo rectangular, que es la morfología típica para los cardiomiocitos en el cuerpo.

En lo que se refiere a la figura 7, una microfotografía muestra la expresión, en los cardiomiocitos de las fibras musculares cardíacas humanas de la figura 5, de biomarcadores troponina T cardíaca (cTNT) (verde) figura 7(A), troponina I cardíaca (cTNI) (verde) figura 7(B), cadena ligera de miosina para células ventriculares (MLC2v) (verde) figura 7(C) y α -actinina (verde) figura 7(D). Se observó la organización de sarcómeros alineados a partir de la tinción. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

En S118, las fibras musculares cardíacas para formar miofibrillas se alinean entre sí a lo largo para obtener miofibrillas. Las miofibrillas y las fibras musculares alineadas se ilustran en la microfotografía de la figura 6. En el día 20, los cardiomiocitos latentes contienen células que imitan a los subtipos ventriculares, auriculares y nodales del corazón según se determina por análisis por pinzamiento zonal (figura 8C).

Los métodos expuestos en la figura 3(C) pueden usarse para generar cardiomiocitos a partir de hESC durante un periodo de 14 días en condiciones químicamente definidas, libres de materiales extraños y sin manipulación genética. El método S100, particularmente en S116, puede usarse también para desarrollar células musculares cardíacas humanas para cardiología regenerativa futura. En una realización, las células madre pluripotentes en el método S100 son hESC.

La figura 9A a la figura 9C muestran los niveles de diversos genes durante diferenciación desde el día 0 hasta el día 30. Se observa que la diferenciación de cardiomiocitos sólo lleva 14 días, y después de eso las células comienzan a madurar. Pueden usarse estos biomarcadores para determinar cuánto han avanzado las células madre en diferenciación. FPKM se refiere a "fragmentos por kilobase de transcrito por millón de lecturas mapeadas", y se calcula usando el software Cufflinks. Estas son cantidades relativas, que pueden usarse para comparación. Como se ve en estas figuras, la cantidad de LIN28A disminuye durante la diferenciación de una manera relativamente lineal, así como POU5F1, TDGF1, SALL4, SOX2, UTF1 y LIN28B. La cantidad de NKX2-5, TNNT2 y MYL3 aumenta durante la diferenciación. Las cantidades de NANOG, KIT, ISL1, TNNC1, MYL4, MYL7, ACTC1 y TPM1 aumentan y alcanzan su valor máximo, entonces disminuyen durante el periodo de 14 días para diferenciación. En la figura 9C, las cantidades de TNNC1, MYL4, MYL7, ACTC1 y TPM1 alcanzan su valor máximo el día 11 del periodo de diferenciación de 14 días.

Más específicamente, la cantidad de POU5F1 es mucho mayor que la de LIN28A entre los días D0 y D3, pero luego la cantidad de LIN28A es mayor que la de POU5F1 desde el día D5 hasta el D14. De forma similar, la cantidad de KIT es mayor que la de ISL1 durante los días D0 a D7, pero la cantidad de ISL1 es mayor que la de KIT durante los días D9 a D14. La cantidad de NKX2-5 es menor que la de ISL1 o la de KIT hasta el día D5, pero luego es mayor que ambas durante los días D7 a D14. En el día D9, el nivel de MYL7 es más de dos veces el nivel de las proteínas MYL3 y MYL4.

El sustrato de cultivo celular se usa en combinación con un medio de cultivo celular. El medio de cultivo celular de la presente divulgación es particularmente adecuado para su uso con un sustrato que contiene (i) laminina-521 o laminina-511 y (ii) laminina-221. Las lamininas LN-511 y LN-521 activan las integrinas $\alpha 6\beta 1$, que a su vez conduce a la activación de la ruta PI3K/Akt. Esto respalda la pluripotencia, autorrenovación y/o proliferación de las células diferenciadas. Se contempla que el sustrato puede consistir en laminina-521 o laminina-511 intacta, como cadenas separadas o como fragmentos de las mismas. La laminina-521 recombinante y la laminina-511 recombinante están comercialmente disponibles. Muchas moléculas diferentes pueden activar la ruta PI3K/Akt, aunque con diferentes eficacias. Por ejemplo, TGF beta 1 y bFGF activan esta ruta. El uso de laminina-521 y/o laminina-511 permite que se reduzca la cantidad de tales moléculas en el medio de cultivo celular. La laminina-521 transmite la dosis más alta de la señal por medio de la integrina $\alpha 6\beta 1$, activando la ruta PI3K/Akt. El uso de laminina-521 permite el paso de una suspensión de una única célula sin la adición de un inhibidor de la rho-cinasa (ROCK) perjudicial para las células para aumentar la supervivencia celular después de la disociación enzimática de una única célula. La adición de la laminina de cardiomiocitos más abundante, LN-221, proporciona señales que dirigen a las hESC pluripotentes hacia el linaje de los cardiomiocitos, pero todavía no se conoce su mecanismo .

Normalmente, los medios de cultivo celular incluyen un gran número y una gran cantidad de diversos factores de crecimiento y citocinas para inhibir la diferenciación y mejorar la proliferación. Una ventaja del medio de cultivo celular de la presente divulgación es que no contiene tantos factores de crecimiento o citocinas o unas cantidades tan altas.

Muy generalmente, el medio de cultivo celular de la presente divulgación requiere cantidades más bajas de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) que las usadas normalmente. Es posible que los dominios que promueven el crecimiento de las moléculas de laminina sean responsables de este efecto. Se contempla que el medio de cultivo celular pueda comprender desde más de cero hasta 3,9 nanogramos por mililitro (ng/ml) de bFGF. El bFGF es bFGF humano de forma que el medio de cultivo celular es totalmente humano y definido. En algunas realizaciones más específicas, el medio de cultivo celular puede comprender 3,5 ng/ml de bFGF o menos. En otras realizaciones, el medio de cultivo celular puede comprender desde 0,5 hasta 3,5 ng/ml de bFGF. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular puede tener cero bFGF, es decir no está presente nada de bFGF.

5 Generalmente, el medio de cultivo celular incluye una fase líquida en la que están disueltos al menos una sal inorgánica, al menos un mineral traza, al menos un sustrato energético, al menos un lípido, al menos un aminoácido, al menos una vitamina y al menos un factor de crecimiento (además de bFGF). La tabla 1 a continuación incluye una lista de tales diversos componentes que pueden estar presentes en el medio de cultivo celular de la presente divulgación, y las concentraciones máxima y mínima si está presente el componente. Se presentan los valores en la notación científica. Por ejemplo, "4,1E-01" debe interpretarse como $4,1 \times 10^{-01}$.

Tabla 1.

10

Componente	Masa molar (g/mol)	Conc. mín. (mM)	Conc. máx. (mM)	Conc. mín. (ng/ml)	Conc. máx. (ng/ml)
SALES INORGÁNICAS					
Cloruro de calcio (anhidro)	110,98	4,1E-01	1,6E+00	4,6E+04	1,8E+05
HEPES	238,3	5,9E+00	1,8E+01	1,4E+06	4,2E+06
Cloruro de litio (LiCl)	42,39	4,9E-01	1,5E+00	2,1E+04	6,2E+04
Cloruro de magnesio (anhidro)	95,21	1,2E-01	3,6E-01	1,1E+04	3,4E+04
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	120,37	1,6E-01	4,8E-01	1,9E+04	5,8E+04
Cloruro de potasio (KCl)	74,55	1,6E+00	4,9E+00	1,2E+05	3,6E+05
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	84,01	9,0E+00	4,4E+01	7,6E+05	3,7E+06
Cloruro de sodio (NaCl)	58,44	4,7E+01	1,4E+02	2,8E+06	8,3E+06
Fosfato de sodio, dibásico (anhidro)	141,96	2,0E-01	5,9E-01	2,8E+04	8,3E+04
Fosfato de sodio, monobásico monohidratado (NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O)	137,99	1,8E-01	5,3E-01	2,4E+04	7,3E+04
MINERALES TRAZA					
Nitrato férrico (Fe(NO ₃) ₃ -9H ₂ O)	404	4,9E-05	1,9E-04	2,0E+01	7,5E+01
Sulfato ferroso heptahidratado (FeSO ₄ -7H ₂ O)	278,01	5,9E-04	1,8E-03	1,6E+02	4,9E+02
Sulfato de cobre (II) pentahidratado (CuSO ₄ -5H ₂ O)	249,69	2,0E-06	8,0E-06	5,1E-01	2,0E+00
Sulfato de cinc heptahidratado (ZnSO ₄ -7H ₂ O)	287,56	5,9E-04	1,8E-03	1,7E+02	5,1E+02
Metavanadato de amonio NH ₄ VO ₃	116,98	5,5E-06	1,6E-05	6,4E-01	1,9E+00 01
Sulfato de manganeso monohidratado (MnSO ₄ -H ₂ O)	169,02	9,9E-07	3,0E-06	1,7E-01 -	5,0E-01
NiSO ₄ -6H ₂ O	262,85	4,9E-07	1,5E-06	1,3E-01	3,8E-01
Selenio	78,96	8,9E-05	2,7E-04	7,0E+00	2,1E+01
Metasilicato de sodio Na ₂ SiO ₃ -9H ₂ O	284,2	4,8E-04	1,4E-03	1,4E+02	4,1E+02
SnCl ₂	189,62	6,2E-07	1,9E-06	1,2E-01	3,5E-01
Sal de amonio del ácido molíbdico	1235,86	9,9E-07	3,0E-06	1,2E+00	3,7E+00
CdCl ₂	183,32	6,1 E-06	1,8E-05	1,1E+00	3,4E+00
CrCl ₃	158,36	9,9E-07	3,0E-06	1,6E-01	4,7E-01
AgNO ₃	169,87	4,9E-07	1,5E-06	8,3E-02	2,5E-01
AlCl ₃ -6H ₂ O	241,43	2,4E-06	7,3E-06	5,9E-01	1,8E+00
Acetato de bario(Ba(C ₂ H ₃ O ₂) ₂)	255,42	4,9E-06	1,5E-05	1,3E+00	3,8E+00
COCl ₂ -6H ₂ O	237,93	4,9E-06	1,5E-05	1,2E+00	3,5E+00
GeO ₂	104,64	2,5E-06	7,5E-06	2,6E-01	7,8E-01
KBr	119	4,9E-07	1,5E-06	5,9E-02	1,8E-01
KI	166	5,0E-07	1,5E-06	8,3E-02	2,5E-01
NaF	41,99	4,9E-05	1,5E-04	2,1E+00	6,2E+00
RbCl	120,92	4,9E-06	1,5E-05	5,9E-01	1,8E+00
ZrOCl ₂ -8H ₂ O	178,13	4,9E-06	1,5E-05	8,7E-01	2,6E+00
SUSTRATOS ENERGÉTICOS					
D-glucosa	180,16	6,9E+00	2,1E+01	1,2E+06	3,7E+06
Piruvato de sodio	110,04	2,0E-01	5,9E-01	2,2E+04	6,5E+04
LÍPIDOS					
Ácido linoleico	280,45	9,4E-05	2,8E-04	2,6E+01	7,9E+01
Ácido lipoico	206,33	2,0E-04	7,8E-04	4,1E+01	1,6E+02
Ácido araquidónico	304,47	6,5E-06	1,9E-05	2,0E+00	5,9E+00
Colesterol	386,65	5,6E-04	1,7E-03	2,2E+02	6,5E+02 DL-

ES 2 742 444 T3

Acetato de DL-alfa-tocoferol	472,74	1,5E-04	4,4E-04	6,9E+01	2,1E+02
Ácido linolénico	278,43	3,5E-05	1,0E-04	9,7E+00	2,9E+01
Ácido mirístico	228,37	4,3E-05	1,3E-04	9,8E+00	2,9E+01
Ácido oleico	282,46	3,5E-05	1,0E-04	9,8E+00	2,9E+01
Ácido palmítico	256,42	3,8E-05	1,1E-04	9,8E+00	2,9E+01
Ácido palmitoleico	254,408	3,9E-05	1,2E-04	9,8E+00	2,9E+01
Ácido esteárico	284,48	3,4E-05	1,0E-04	9,8E+00	2,9E+01
AMINOÁCIDOS					
L-alanina	89,09	2,5E-02	2,1E-01	2,2E+03	1,8E+04
Clorhidrato de L-arginina	147,2	2,7E-01	1,5E+00	4,0E+04	2,2E+05
L-asparagina-H ₂ O	150,13	5,0E-02	2,1E-01	7,5E+03	3,1E+04
L-ácido aspártico	133,1	2,5E-02	2,1E-01	3,3E+03	2,7E+04
L-cisteína-HCl-H ₂ O	175,63	3,9E-02	1,2E-01	6,9E+03	2,1E+04
Diclorhidrato de L-cistina	313,22	3,9E-02	1,2E-01	1,2E+04	3,7E+04
L-ácido glutámico	147,13	2,5E-02	2,1E-01	3,7E+03	3,0E+04
L-glutamina	146,15	1,5E+00	4,4E+00	2,1E+05	6,4E+05
Glicina	75,07	1,5E-01	4,4E-01	1,1E+04	3,3E+04
Monoclorhidrato de L-histidina monohidratado	209,63	5,9E-02	1,8E-01	1,2E+04	3,7E+04
L-isoleucina	131,17	1,6E-01	4,9E-01	2,1E+04	6,4E+04
L-leucina	131,17	1,8E-01	5,3E-01	2,3E+04	7,0E+04
Clorhidrato de L-lisina	182,65	2,0E-01	5,9E-01	3,6E+04	1,1E+05
L-metionina	149,21	4,5E-02	1,4E-01	6,8E+03	2,0E+04
L-fenilalanina	165,19	8,5E-02	2,5E-01	1,4E+04	4,2E+04
L-prolina	115,13	1,1E-01	3,2E-01	1,2E+04	3,7E+04
L-serina	105,09	1,5E-01	4,4E-01	1,5E+04	4,6E+04
L-treonina	119,12	1,8E-01	5,3E-01	2,1E+04	6,3E+04
L-triptófano	204,23	1,7E-02	5,2E-02	3,5E+03	1,1E+04
Sal disódica de L-tirosina hidratada	225,15	8,4E-02	3,7E-01	1,9E+04	8,4E+04
L-valina	117,15	1,8E-01	5,3E-01	2,1E+04	6,2E+04
VITAMINAS					
Ácido ascórbico	176,12	1,3E-01	3,8E-01	2,2E+04	6,7E+04
Biotina	244,31	5,6E-06	1,7E-05	1,4E+00	4,1E+00
B12	1355,37	2,0E-04	5,9E-04	2,7E+02	8,0E+02
Cloruro de colina	139,62	2,5E-02	7,5E-02	3,5E+03	1,1E+04
Pantotenato de D-calcio	238,27	1,8E-03	1,4E-02	4,4E+02	3,4E+03
Ácido fólico	441,4	2,4E-03	7,1E-03	1,0E+03	3,1E+03
i-Inositol	180,16	2,7E-02	1,1E-01	4,9E+03	1,9E+04
Niacinamida	122,12	6,5E-03	2,0E-02	7,9E+02	2,4E+03
Clorhidrato de piridoxina	205,64	3,8E-03	1,1E-02	7,8E+02	2,4E+03
Riboflavina	376,36	2,3E-04	6,8E-04	8,6E+01	2,6E+02
Clorhidrato de tiamina	337,27	3,3E-03	3,6E-02	1,1E+03	1,2E+04
FACTORES DE CRECIMIENTO/PROTEÍNAS					
GABA	103,12	0	1,5E+00	0	1,5E+05
Ácido piperólico	129	0	1,5E-03	0	1,9E+02
bFGF	18000	0	2,17E-07	0	3,9E+00
TGF beta 1	25000	0	3,5E-08	0	8,8E-01
Insulina humana	5808	0	5,9E-03	0	3,4E+04
Holotransferrina humana	78500	0	2,1E-04	0	1,6E+04
Albúmina sérica humana	67000	0	2,9E-01	0	2,0E+07
Glutati6n (reducido)	307,32	0	9,6E-03	0	2,9E+03
OTROS COMPONENTES					
Hipoxantina de Na	136,11	5,9E-03	2,6E-02	8,0E+02	3,6E+03
Rojo fenol	354,38	8,5E-03	2,5E-02	3,0E+03	9,0E+03
Putrescina-2HCl	161,07	2,0E-04	5,9E-04	3,2E+01	9,5E+01
Timidina	242,229	5,9E-04	1,8E-03	1,4E+02	4,3E+02
2-mercaptoetanol	78,13	4,9E-02	1,5E-01	3,8E+03	1,1E+04
Plur6nico F-68	8400	1,2E-02	3,5E-02	9,8E+04	2,9E+05
Tween 80	1310	1,6E-04	4,9E-04	2,2E+02	6,5E+02

La fase líquida del medio de cultivo celular puede ser agua, suero o albúmina.

Muchos de los ingredientes o componentes enumerados anteriormente en la tabla 1 no son necesarios o pueden usarse en concentraciones más bajas.

5 Se contempla que el medio de cultivo celular puede contener insulina o un sustituto de insulina. De forma similar, el medio de cultivo celular puede contener transferrina o un sustituto de transferrina. Sin embargo, en realizaciones más específicas, se contempla que el medio de cultivo celular puede no contener (1) insulina o sustituto de insulina, o (2) transferrina o sustituto de transferrina, o cualquier combinación de estos dos componentes. Alternativamente, en otras realizaciones, se contempla que el medio de cultivo celular puede contener (1) insulina o sustituto de insulina, o (2) transferrina o sustituto de transferrina, o cualquier combinación de estos dos componentes.

10 Se observará que otros medios de cultivo celular pueden contener factores de crecimiento tales como interleucina-1 beta (IL-1 β o catabolina), interleucina-6 (IL6) o factor derivado de epitelio pigmentario (PEDF). Tales factores de crecimiento no están presentes en el medio de cultivo celular de la presente divulgación.

15 Una fórmula específica para un medio de cultivo celular se proporciona en la tabla 2:

Tabla 2.

Componente	Cantidad	Unidad
bFGF	0,39	microgramo (μ g)
Albúmina	1,34	miligramo (mg)
Insulina	2	mg
Cloruro de litio	4,23	mg
GABA	0,01	mg
TGF beta 1	0,06	μ g
Ácido pipecólico	0,013	mg
L-Glutamina	2,92	gramos
Disolución de aminoácidos no esenciales de MEM	1	ml
DMEM/F12	100	ml

20 A este respecto, una disolución de aminoácidos no esenciales MEM se proporciona normalmente en un concentrado 100x. El MEM de la tabla 2 se usa después de volver a diluir 1x, y contiene los siguientes aminoácidos en las siguientes concentraciones enumeradas en la tabla 3:

Tabla 3.

Aminoácidos de MEM	Concentración (ng/ml)
Glicina	7,50E+03
L-alanina	8,90E+03
L-asparagina	1,32E+04
L-ácido aspártico	1,33E+04
L-prolina	1,15E+04
L-serina	1,05E+04

DMEM/F12 contiene los siguientes componentes enumerados en la tabla 4:

Tabla 4.

Componentes de DMEM/F12	Concentración (ng/ml)
Glicina	187,5
L-alanina	44,5
Clorhidrato de L-arginina	1475
L-asparagina-H ₂ O	75
L-ácido aspártico	66,5
Clorhidrato de L-cisteína-H ₂ O	175,6
L-cistina 2HCl	312,9
Ácido L-glutámico	73,5
L-glutamina	3650
Clorhidrato de L-histidina-H ₂ O	314,8
L-isoleucina	544,7
L-leucina	590,5
Clorhidrato de L-lisina	912,5
L-metionina	172,4

L-fenilalanina	354,8
L-prolina	172,5
L-serina	262,5
L-treonina	534,5
L-triptófano	90,2
Sal disódica de L-tirosina dihidratada	557,9
L-valina	528,5
Biotina	0,035
Cloruro de colina	89,8
Pantotenato de D-calcio	22,4
Ácido fólico	26,5
Niacinamida	20,2
Clorhidrato de piridoxina	20
Riboflavina	2,19
Clorhidrato de tiamina	21,7
Vitamina B ₁₂	6,8
i-Inositol	126
Cloruro de calcio (CaCl ₂) (anhidro)	1166
Sulfato cúprico (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0,013
Nitrato férrico (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	0,5
Sulfato férrico (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	4,17
Cloruro de magnesio (anhidro)	286,4
Sulfato de magnesio (MgSO ₄) (anhidro)	488,4
Cloruro de potasio (KCl)	3118
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	24380
Cloruro de sodio (NaCl)	69955
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄) anhidro	710,2
Fosfato de sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	625
Sulfato de cinc (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	4,32
D-Glucosa (Dextrosa)	31510
Hipoxantina Na	23,9
Ácido linoleico	0,42
Ácido lipoico	1,05
Rojo fenol	81
Putrescina 2HCl	0,81
Piruvato de sodio	550
Timidina	3,65

En particular, el medio de cultivo celular puede tener una concentración de albúmina de al menos 0,3 milimolar (mM). La tabla 5 a continuación proporciona una formulación para un medio de cultivo celular que contiene albúmina adicional.

- 5 En realizaciones particulares, la cantidad de albúmina sérica humana (HSA) puede variarse desde una concentración de 0,195 mM hasta 1 mM, incluyendo desde 0,3 mM hasta 1 mM o desde 0,3 mM hasta aproximadamente 0,4 mM. La cantidad de bFGF puede variarse también desde 0 hasta aproximadamente 105 ng/ml, o desde 0 hasta 3,9 ng/ml, o desde 0,5 ng/ml hasta 3,5 ng/ml. Estas dos variaciones en la cantidad de HSA y bFGF pueden tener lugar independientemente o conjuntamente.
- 10

Tabla 5. Formulación de mTeSR1.

Componente de mTeSR1	masa molar (g/mol)	Concentración (ng/ml)	Concentración (mM)
SALES INORGÁNICAS			
Cloruro de calcio (anhidro)	110,98	9,14E+04	8,24E-01
HEPES	238,3	2,81E+06	1,18E+01
Cloruro de litio (LiCl)	42,39	4,15E+04	9,80E-01
Cloruro de magnesio (anhidro)	95,21	2,26E+04	2,37E-01
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)	120,37	3,84E+04	3,19E-01
Cloruro de potasio (KCl)	74,55	2,43E+05	3,26E+00
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	84,01	1,51E+06	1,80E+01
Cloruro de sodio (NaCl)	58,44	5,53E+06	9,46E+01
Fosfato de sodio, dibásico (anhidro)	141,96	5,56E+04	3,92E-01
Fosfato de sodio, monobásico monohidratado (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	137,99	4,90E+04	3,55E-01

ES 2 742 444 T3

MINERALES TRAZA			
Nitrato férrico (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	404	3,92E+01	9,71E-05
Sulfato ferroso heptahidratado (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	278,01	3,28E+02	1,18E-03
Sulfato de cobre (II) pentahidratado (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	249,69	1,02E+00	4,08E-06
Sulfato de cinc pentahidratado (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	287,56	3,39E+02	1,18E-03
Metavanadato de amonio NH ₄ VO ₃	116,98	1,28E+00	1,09E-05
Sulfato de manganeso monohidratado (MnSO ₄ ·H ₂ O)	169,02	3,33E-01	1,97E-06
NiSO ₄ ·6H ₂ O	262,85	2,55E-01	9,70E-07
Selenio	78,96	1,40E+01	1,77E-04
Metasilicato de sodio Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	284,2	2,75E+02	9,66E-04
SnCl ₂	189,62	2,35E-01	1,24E-06
Sal de amonio del ácido molíbdico	1235,86	2,43E+00	1,97E-06
CdCl ₂	183,32	2,24E+00	1,22E-05
CrCl ₃	158,36	3,14E-01	1,98E-06
AgNO ₃	169,87	1,67E-01	9,81E-07
AlCl ₃ ·6H ₂ O	241,43	1,18E+00	4,87E-06
Acetato de bario (Ba(C ₂ H ₃ O ₂) ₂)	255,42	2,50E+00	9,79E-06
COCl ₂ ·6H ₂ O	237,93	2,33E+00	9,81E-06
GeO ₂	104,64	5,20E-01	4,97E-06
KBr	119	1,18E-01	9,89E-07
KI	166	1,66E-01	1,00E-06
NaF	41,99	4,13E+00	9,83E-05
RbCl	120,92	1,19E+00	9,81E-06
ZrOCl ₂ ·8H ₂ O	178,13	1,75E+00	9,80E-06
SUSTRATOS ENERGÉTICOS			
D-glucosa	180,16	2,47E+06	1,37E+01
Piruvato de sodio	110,04	4,31E+04	3,92E-01
LÍPIDOS			
Ácido linoleico	280,45	5,27E+01	1,88E-04
Ácido lipoico	206,33	8,25E+01	4,00E-04
Ácido araquidónico	304,47	3,93E+00	1,29E-05
Colesterol	386,65	4,33E+02	1,12E-03
Acetato de DL-alfa-tocoferol	472,74	1,37E+02	2,90E-04
Ácido linolénico	278,43	1,95E+01	6,99E-05
Ácido mirístico	228,37	1,96E+01	8,59E-05
Ácido oleico	282,46	1,96E+01	6,94E-05
Ácido palmítico	256,42	1,96E+01	7,65E-05
Ácido palmitoleico	254,408	1,96E+01	7,71E-05
Ácido esteárico	284,48	1,96E+01	6,89E-05
AMINOÁCIDOS			
L-alanina	89,09	1,22E+04	1,37E-01
Clorhidrato de L-arginina	147,2	8,07E+04	5,48E-01
L-asparagina-H ₂ O	150,13	2,06E+04	1,37E-01
L-ácido aspártico	133,1	1,82E+04	1,37E-01
L-cisteína-HCl-H ₂ O	175,63	1,38E+04	7,83E-02
Diclorhidrato de L-cistina	313,22	2,45E+04	7,83E-02
L-ácido glutámico	147,13	2,02E+04	1,37E-01
L-glutamina	146,15	4,30E+05	2,94E+00
Glicina	75,07	2,21E+04	2,94E-01
Monoclorhidrato de L-histidina monohidratado	209,63	2,47E+04	1,18E-01
L-isoleucina	131,17	4,28E+04	3,26E-01
L-leucina	131,17	4,64E+04	3,54E-01
Clorhidrato de L-lisina	182,65	7,14E+04	3,91E-01
L-metionina	149,21	1,35E+04	9,06E-02

ES 2 742 444 T3

L-fenilalanina	165,19	2,79E+04	1,69E-01
L-prolina	115,13	2,49E+04	2,16E-01
L-serina	105,09	3,09E+04	2,94E-01
L-treonina	119,12	4,19E+04	3,52E-01
L-triptófano	204,23	7,07E+03	3,46E-02
Sal disódica de L-tirosina hidratada	225,15	3,78E+04	1,68E-01
L-valina	117,15	4,16E+04	3,55E-01
VITAMINAS			
Ácido ascórbico	176,12	4,46E+04	2,53E-01
Biotina	244,31	2,74E+00	1,12E-05
B12	1355,37	5,34E+02	3,94E-04
Cloruro de colina	139,62	7,02E+03	5,03E-02
Pantotenato de D-calcio	238,27	8,79E+02	3,69E-03
Ácido fólico	441,4	2,08E+03	4,71E-03
i-Inositol	180,16	9,89E+03	5,49E-02
Niacinamida	122,12	1,59E+03	1,30E-02
Clorhidrato de piridoxina	205,64	1,57E+03	7,62E-03
Riboflavina	376,36	1,72E+02	4,56E-04
Clorhidrato de tiamina	337,27	8,16E+03	2,42E-02
FACTORES DE CRECIMIENTO/PROTEÍNAS			
GABA	103,12	1,01E+05	9,79E-01
Ácido pipercolico	129	1,27E+02	9,84E-04
bFGF	18000	1,04E+02	5,77E-06
TGF beta 1	25000	5,88E-01	2,35E-08
Insulina humana	5808	2,28E+04	3,92E-03
Holotransferrina humana	78500	1,08E+04	1,37E-04
Albúmina sérica humana	67000	1,31E+07	1,95E-01
Glutación (reducido)	307,32	1,96E+03	6,38E-03
OTROS COMPONENTES			
Hipoxantina de Na	136,11	1,61E+03	1,18E-02
Rojo fenol	354,38	5,99E+03	1,69E-02
Putrescina-2HCl	161,07	6,36E+01	3,95E-04
Timidina	242,229	2,86E+02	1,18E-03
2-mercaptoetanol	78,13	7,66E+03	9,80E-02
Plurónico F-68	8400	1,96E+05	2,33E-02
Tween 80	1310	4,31E+02	3,29E-04

5 La combinación del sustrato de laminina con el medio de cultivo celular de la presente divulgación da como resultado un sistema de cultivo celular que puede ser más barato pero que proporciona una mayor eficiencia en el mantenimiento de células diferenciadas. En esencia, todo lo que se requiera son lamininas específicas y una cantidad mínima de nutrición. La laminina usada en combinación con este medio de cultivo celular es o bien LN-511 o bien LN-521 en combinación con LN-221.

10 En algunas realizaciones, el sistema de cultivo celular incluye un sustrato de combinación de cultivo celular con (i) laminina-221 y (ii) una de laminina-511 o laminina-521, y mantiene cardiomiocitos humanos diferenciados más tiempo de lo que muestran los sustratos de fibronectina convencionales.

15 El método de diferenciación de los cardiomiocitos a partir de las células madre pluripotentes tal como se describe representa por primera vez un protocolo de diferenciación para células hES que genera de una manera controlable células progenitoras positivas para islote-1, y entonces posteriormente, cardiomiocitos TnT que expresan latidos regulares *in vitro*. La lamininas 521, 511 y 221 usadas en el método pueden producirse en condiciones de BPM de forma que forman subestratos humanos apropiados para la derivación, expansión y diferenciación de células para medicina regenerativa. El método puede llevarse a cabo sin la presencia de ninguna molécula derivada de animales lo que es importante desde el punto de vista de desarrollar células progenitoras cardiacas y cardiomiocitos diferenciados para fines de terapia celular humana o para poner a prueba los efectos de fármacos en cardiomiocitos humanos.

20 La aplicabilidad del método para la diferenciación de cardiomiocitos en aplicaciones industriales puede incluir la producción industrial de LN-221 de calidad BPM. Usando el método, será posible producir grandes cantidades de células progenitoras cardiacas derivadas de células hES y cardiomiocitos requeridos para terapia celular de lesión

del músculo cardiaco. Esta producción de las células puede requerir cultivar en (i) LN-521 o LN-511 humana y (ii) LN-221. El método proporciona avances significativos para la producción de células progenitoras cardíacas humanas y cardiomiocitos para la realización de pruebas de cardiotoxicidad y fármacos. La industria farmacéutica se enfrenta actualmente a una tasa baja de nuevos posibles fármacos, procesos de descubrimiento largos, costes de desarrollo crecientes y altas tasas de desgaste durante las fases posteriores de desarrollo de fármacos.

Los sistemas celulares actuales usados en investigación y desarrollo están estorbados por el hecho de que las células o líneas celulares primarias o bien pierden rápidamente sistemas funcionales importantes, o bien ya carecen de estas propiedades. Esto puede limitar su uso para la validación de propiedades farmacocinéticas o la predicción de toxicidad inesperada. Además, muchos tipos de células primarias humanas, tales como cardiomiocitos y células neuronales, son casi inaccesibles para estas aplicaciones. Los sistemas *in vivo* e *in vitro* basados en animales usados en el descubrimiento de fármacos ni son rentables ni relevantes en clínica o predictivos debido a la baja concordancia entre los datos de animales y el ser humano. Existe una fuerte necesidad de ensayos celulares nuevos, innovadores con alta relevancia humana donde pueden validarse nuevos fármacos candidatos. Las células madre pluripotentes humanas que se han diferenciado eficazmente en las células funcionales poseen un suministro virtualmente ilimitado de células con una amplia diversidad de aplicaciones, englobando desde el desarrollo farmacéutico hasta el uso directo en terapias celulares humanas.

Los siguientes ejemplos son para los propósitos de ilustrar adicionalmente la presente divulgación. Los ejemplos son simplemente ilustrativos y no pretenden limitar los dispositivos realizados según la divulgación a los materiales, condiciones o parámetros de procesos expuestos en los mismos.

Ejemplos

Ejemplo 1: identificación de LN-521 o LN-511 y LN-221 para sustrato de combinación usado en la diferenciación de cardiomiocitos

El método descrito para diferenciar cardiomiocitos a partir de células madre pluripotentes humanas incluye dos isoformas de laminina específicas de humanos (i) LN-521 o LN-511 y (ii) LN-221 que, basándose en el análisis de la expresión del músculo cardiaco humano, podrían considerarse importantes como sustratos de cultivo celular. Basándose en el análisis de ARNm, las cadenas de laminina, alfa-2, beta-2 y gamma-1 son las cadenas de laminina alfa, beta y gamma más altamente expresadas en el músculo cardiaco maduro. Las cadenas alfa-5 y beta-1 son menos abundantes, y alfa-1, alfa-3, beta-3, beta-4, gamma-2 y gamma-3 muestran expresión baja o no detectable. Se supone, por tanto, sin pretender vincularse a ninguna teoría en particular que LN-221, que tiene la expresión más alta, es de mayor importancia para el desarrollo y mantenimiento del fenotipo y función de los cardiomiocitos.

Para someter a prueba esta hipótesis, los ADNc de longitud total para las cadenas de laminina humana, alfa-2, beta-2 y gamma-1, se insertaron en vectores de expresión humanos después de lo cual se realizaron secuencialmente la transfección de células HEK293 (del riñón embrionario humano), la selección de clones y la expansión según se describió previamente para LN-511. Información adicional sobre el proceso descrito previamente para LN-511 se encuentra en Doi, M., Thyboll, J., Kortessmaa, J., Jansson, K., Livanainen, A., Parvardeh, M., Timpl, R., Hedin, U., Swedenborg, J., y Tryggvason, K. 2002. Recombinant human laminin-10 (LN-511). Production, purification, and migration-promoting activity on vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 277:12741-12748, que se incorpora como referencia. Se seleccionó una línea celular que expresa altas cantidades de LN-221 trimérica producida como recombinante para la producción de LN-221. La LN-221 recombinante se usó junto con la LN-521 o la LN-511 altamente asociadas con células madre embrionarias para examinar si LN-221 respalda su diferenciación a cardiomiocitos. Los resultados demuestran que usando la LN-521 o LN-511 específica en combinación con la LN-221 altamente específica de músculo cardiaco como recubrimientos de cultivo celular, las células hES pudieron diferenciarse primero en células progenitoras de cardiomiocitos positivas para islote-1 y, entonces después de cultivo adicional, en cardiomiocitos latentes que expresan, por ejemplo, biomarcadores específicos como TnT. Los métodos para diferenciar células progenitoras cardíacas y cardiomiocitos maduros a partir de células madre pluripotentes son por tanto controlables.

Ejemplo 2: generación de fibras musculares similares al músculo estriado

Se mantuvieron las hESC pluripotentes en LN-521 usando un medio de mantenimiento químicamente definido, Nutristem (Stemgent), sin la necesidad de inhibidor de ROCK. Nutristem contiene cantidad baja de bFGF (4 ng/ml) comparado con mTesR1 que contiene cantidad innecesariamente alta (100 ng/ml) y albúmina de suero bovino (BSA). Antes de la diferenciación, se sembraron 2×10^5 células/cm² en pocillos recubiertos durante la noche con una mezcla al 50% de LN-521 o LN-511 y LN-221 (proporcionadas por BioLamina).

Sin pretender vincularse a ninguna teoría en particular, lo lógico es que LN-221 es la laminina más abundante expresada en la membrana basal ultrafina que rodea las fibras musculares cardíacas humanas. La LN-521 o LN-511 subyacente puede promover la unión y proliferación celulares, mientras que la LN-221 proporciona un nicho natural para la formación de cardiomiocitos.

5 Se mantuvieron las células durante 4 días para lograr subconfluencia y en el día 0 de diferenciación, se añadieron 12 μ M de CHIR 99021 (Tocris) (un inhibidor de GSK-3) a medios de diferenciación (RPMI/B27-insulina) para inhibir la fosforilación de β -catenina lo que estimula actividades de señalización de Wnt canónica durante 24 horas. Al día siguiente (día 1), se cambiaron los medios a medios de diferenciación y se dejaron proliferar las células positivas para Brachyury. En el día 3, se inhibieron las actividades de Wnt mediante la aplicación de 5 μ M de inhibidor de IWP 2 (Tocris) sobre las células, esto promoverá especificación mesodérmica cardíaca. En el día 5, se cambió el medio a medio basal (RPMI/B27) después de lo cual todos los cambios de medio subsiguientes fueron cada 3 días. Se formará fibra muscular similar a músculo estriado con latido regular en el día 14. Estos cardiomiocitos se tiñeron entonces con marcadores específicos cardíacos (troponina T, troponina I, MF-20) para microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Además de la diferenciación completa, la especificación de células pluripotentes a células progenitoras cardíacas positivas para islote-1 se completará en el día 5 donde estas células pueden identificarse y mantenerse en LN-521.

15 Ejemplo 3. Estabilización y expansión de células progenitoras de cardiomiocitos según se ejemplifica mediante células positivas para islote-1 y NKX2.5 en LN-511 o LN-521.

20 La maduración de células progenitoras de cardiomiocitos puede detenerse y mantenerse en su fase de diferenciación (por ejemplo positividad para islote-1) situándolas o bien en matriz de LN-511 o bien en matriz de LN-521. En el día 5 del protocolo de diferenciación, las células se disociaron con tampón TrypLE y se sembraron en placa otra vez en nuevos pocillos revestidos con LN-511/LN-521 con medios que contienen inhibidor de GSK que potenciará la señalización de Wnt, el inhibidor BMP y el inhibidor de activina/nodal. El paso continuo de células en subconfluencia asegura la estabilización y expansión de las células progenitoras altamente homogéneas.

25 La inmunotinción de las células progenitoras mostró que son positivas al 99% para ambos factores de transcripción islote-1 y NKX2.5. Estas células pueden hacerse pasar entonces al menos 6 veces de tal manera que las células mantienen el 99% de positividad para esos dos marcadores de célula progenitora de cardiomiocitos. Estas células progenitoras pueden criopreservarse también a largo plazo en medio de criopreservación mFreSR en nitrógeno líquido. En caso necesario, pueden descongelarse las células y las mismas proliferarán o se diferenciarán fácilmente en lamininas. Estos resultados son importantes ya que tales células progenitoras probablemente se vuelvan mejores para el trasplante de células en la reparación de músculo cardíaco dañado.

30

REIVINDICACIONES

1. Método para diferenciar cardiomiocitos a partir de una célula madre pluripotente, que comprende:
 - 5 sembrar células madre pluripotentes sobre un sustrato que incluye (i) LN-521 o LN-511 y (ii) LN-221; y
 cultivar las células madre pluripotentes en un medio basal para formar células progenitoras de cardiomiocitos.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, que incluye además:

diferenciar las células progenitoras de cardiomiocitos en el sustrato de combinación de cultivo celular para formar cardiomiocitos maduros.
- 15 3. Método según la reivindicación 1, que incluye además cultivar las células madre pluripotentes en presencia de un inhibidor de GSK-3 para estimular la señalización de Wnt.
4. Método según la reivindicación 3, que incluye además cultivar las células madre pluripotentes en el medio basal desprovisto de inhibidores.
- 20 5. Método según la reivindicación 2, que incluye además transformar los cardiomiocitos maduros en fibras musculares agregadas.
6. Método según la reivindicación 4, que incluye además cultivar las células madre pluripotentes en presencia de inhibidor de Wnt para suprimir la señalización de Wnt.
- 25 7. Método según la reivindicación 1, en el que al menos una de LN-521, LN-511 y LN-221 es una laminina recombinante efectiva.
- 30 8. Método según la reivindicación 1, en el que el sustrato de cultivo celular y el sustrato de combinación de cultivo celular no contienen ningún inhibidor de la diferenciación, células nutrientes, inductores de diferenciación ni inhibidores de apoptosis.
9. Método según la reivindicación 1, que incluye además aplicar un medio de cultivo celular a las células madre pluripotentes.
- 35 10. Método según la reivindicación 1, que incluye además mantener las células madre pluripotentes en un sustrato de cultivo celular que incluye LN-521 o LN-511 y sin LN-221.
- 40 11. Método según la reivindicación 1, en el que la célula madre pluripotente es una célula madre embrionaria humana (hESC) o una célula madre pluripotente inducida (hiPSC).
12. Método para formar una fibra muscular cardíaca con un fenotipo estriado latiente, que comprende:
 - 45 diferenciar células madre pluripotentes en un sustrato que incluye (i) LN-521 o LN-511 y (ii) LN-221, para formar cardiomiocitos maduros; y
 transformar los cardiomiocitos maduros en una fibra muscular cardíaca similar a cardiomiocitos que tiene un fenotipo estriado latiente.
- 50 13. Método según la reivindicación 1, en el que las células progenitoras de cardiomiocitos expresan factor de transcripción NKX2.5 y islote-1.
14. Método según la reivindicación 5, en el que las fibras musculares agregadas expresan los biomarcadores de filamento de sarcómero de miosina (MF-20), cadena ligera de miosina para células ventriculares (MLC2v) y troponina T.
- 55 15. Método según la reivindicación 14, en el que la célula madre pluripotente es una célula madre embrionaria humana (hESC) o una célula madre pluripotente inducida (hiPSC).

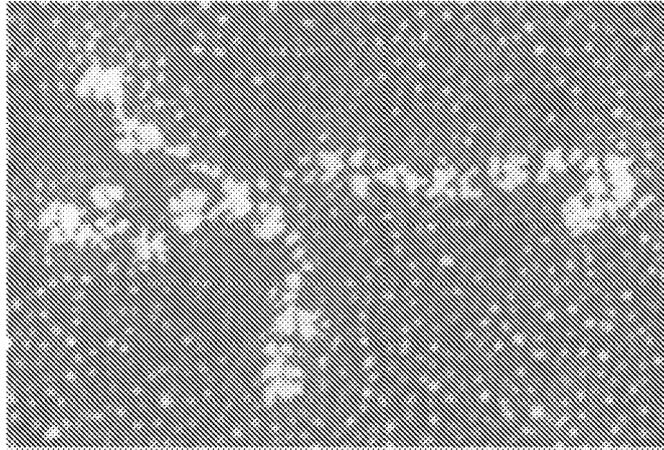


FIG. 1

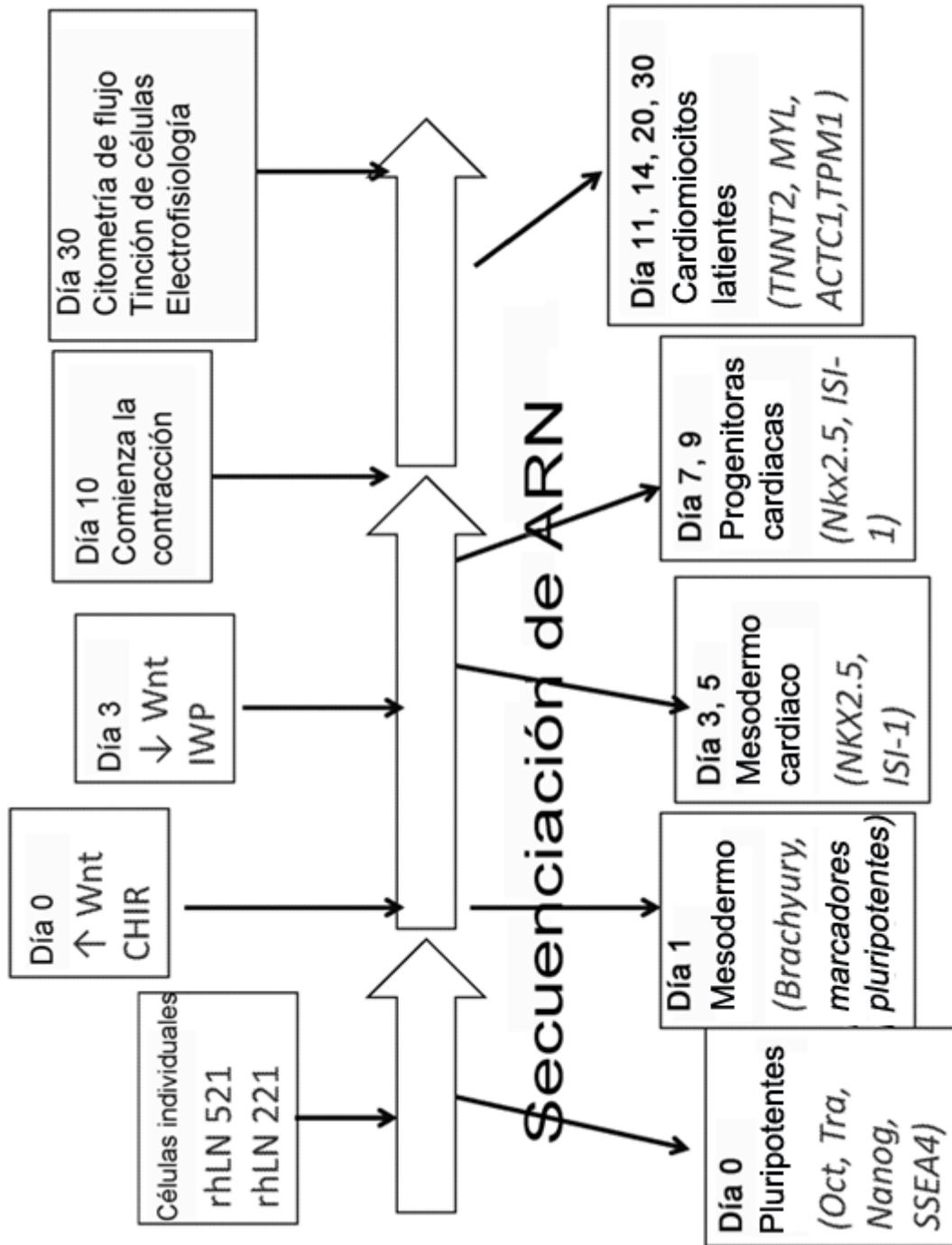


FIG. 3(A)

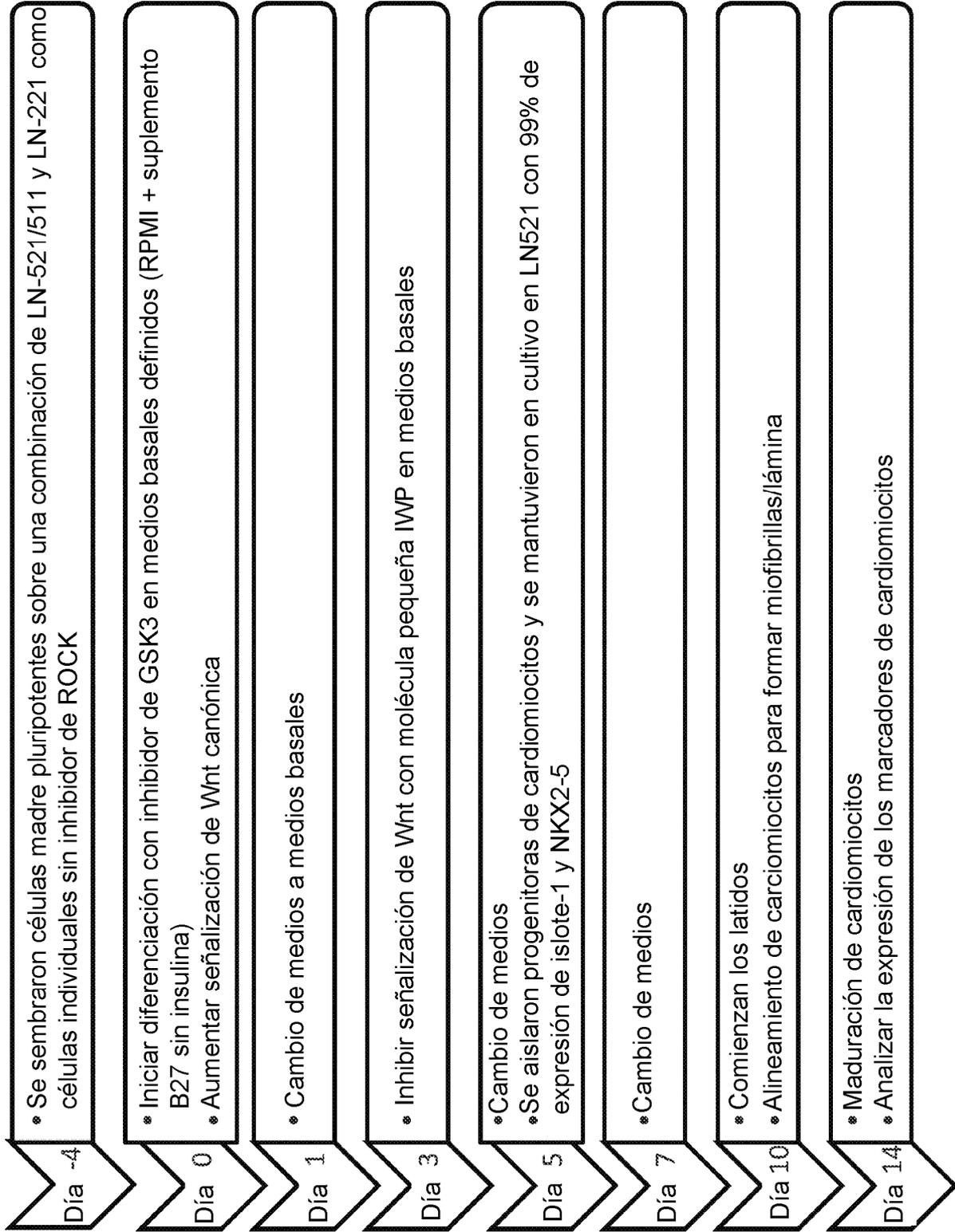


FIG. 3(B)

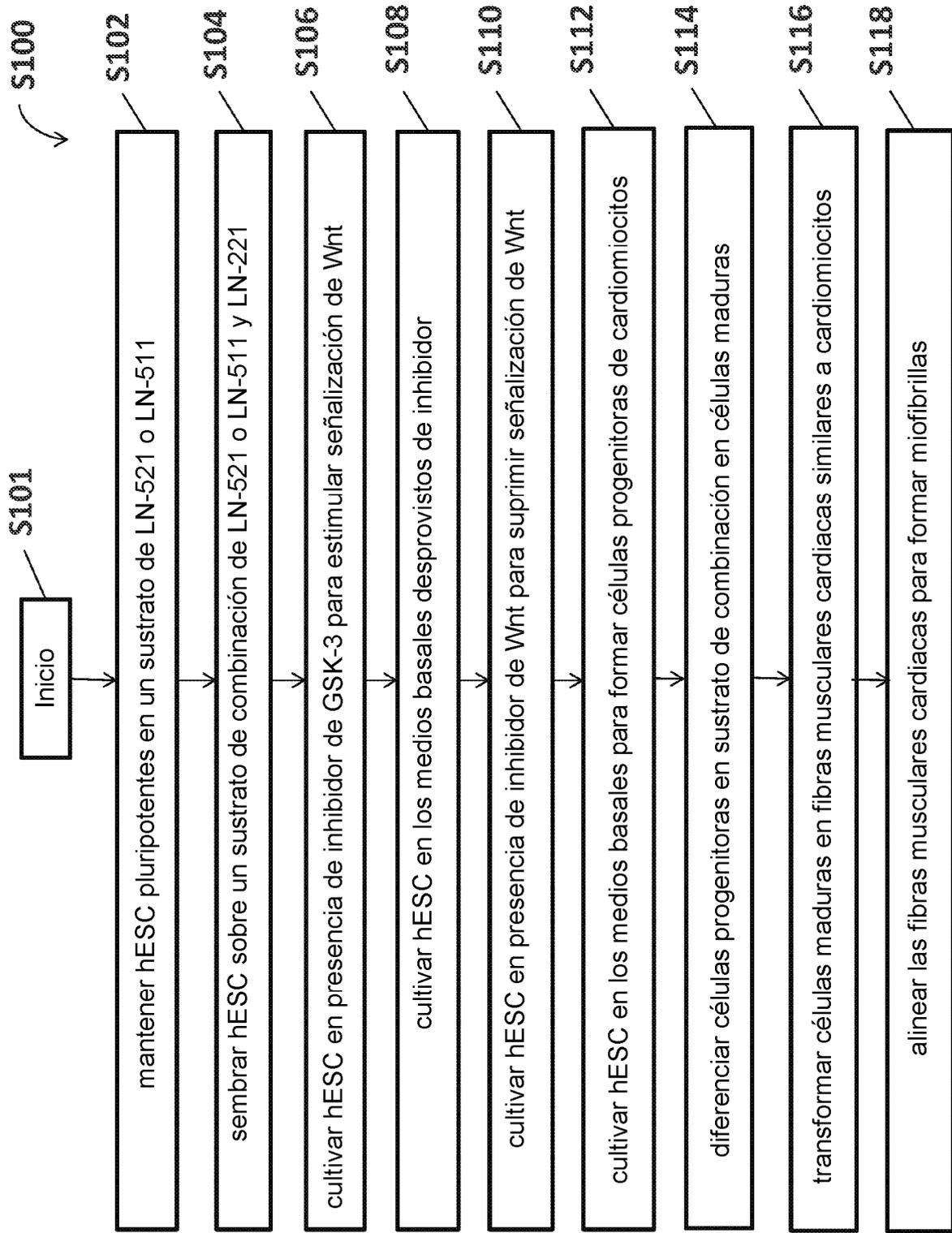


FIG. 3(C)

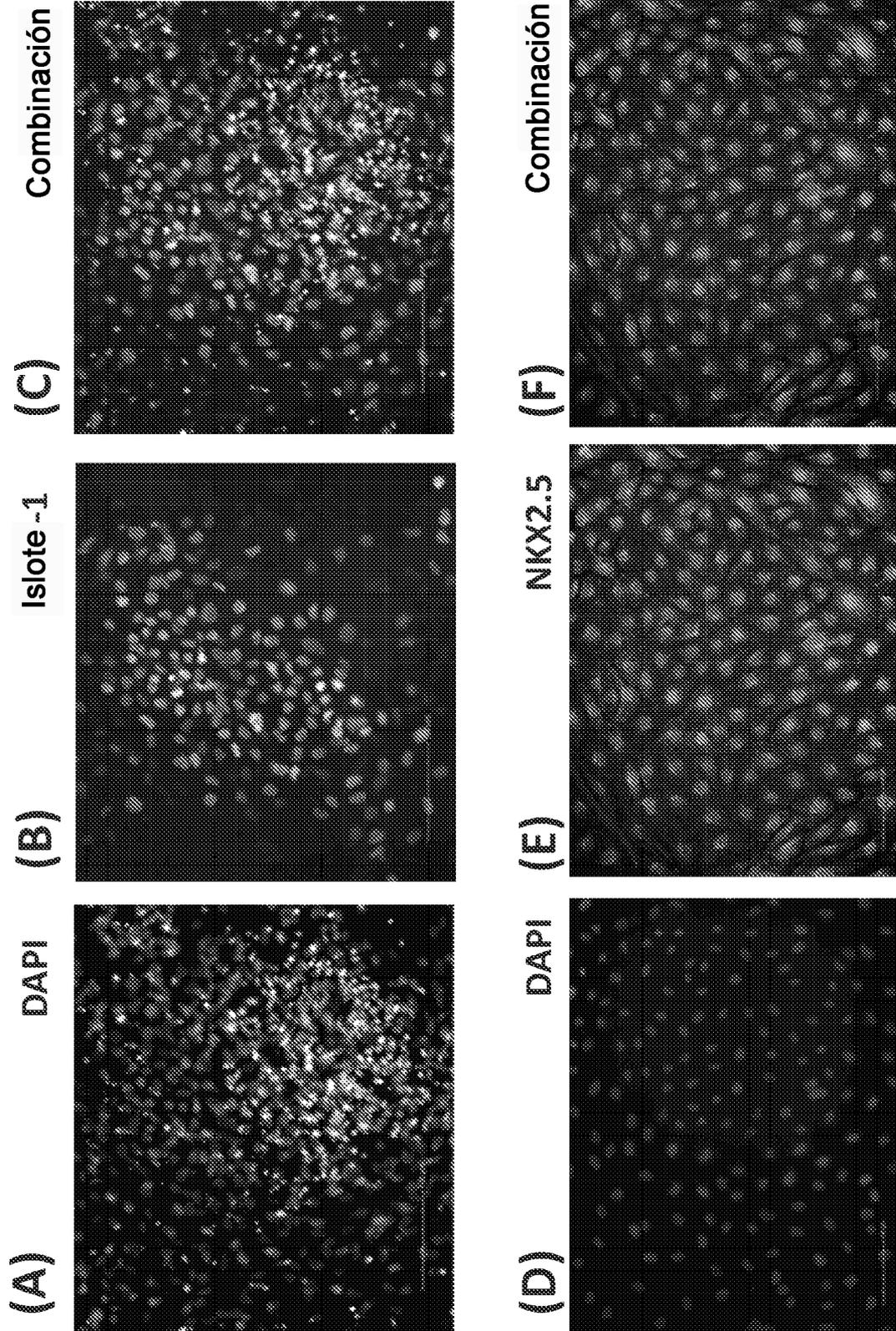


FIG. 4



FIG. 5A

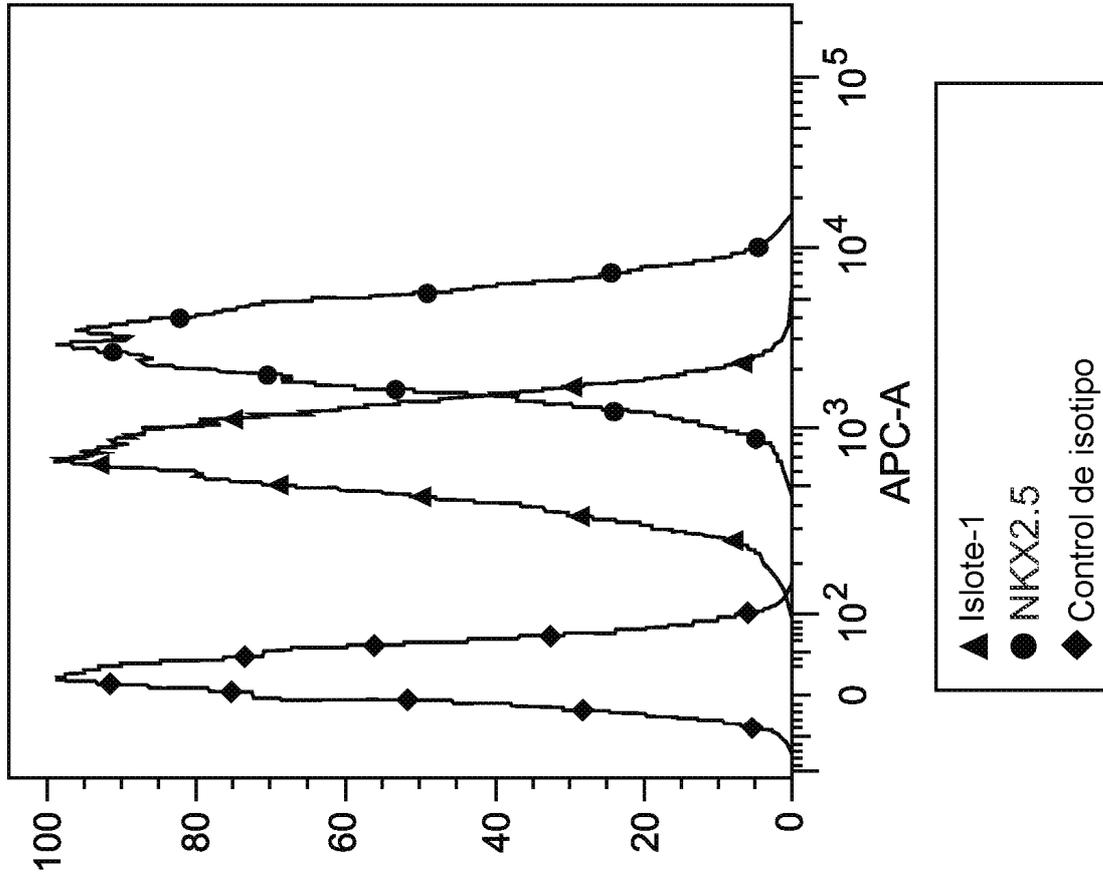


FIG. 5C

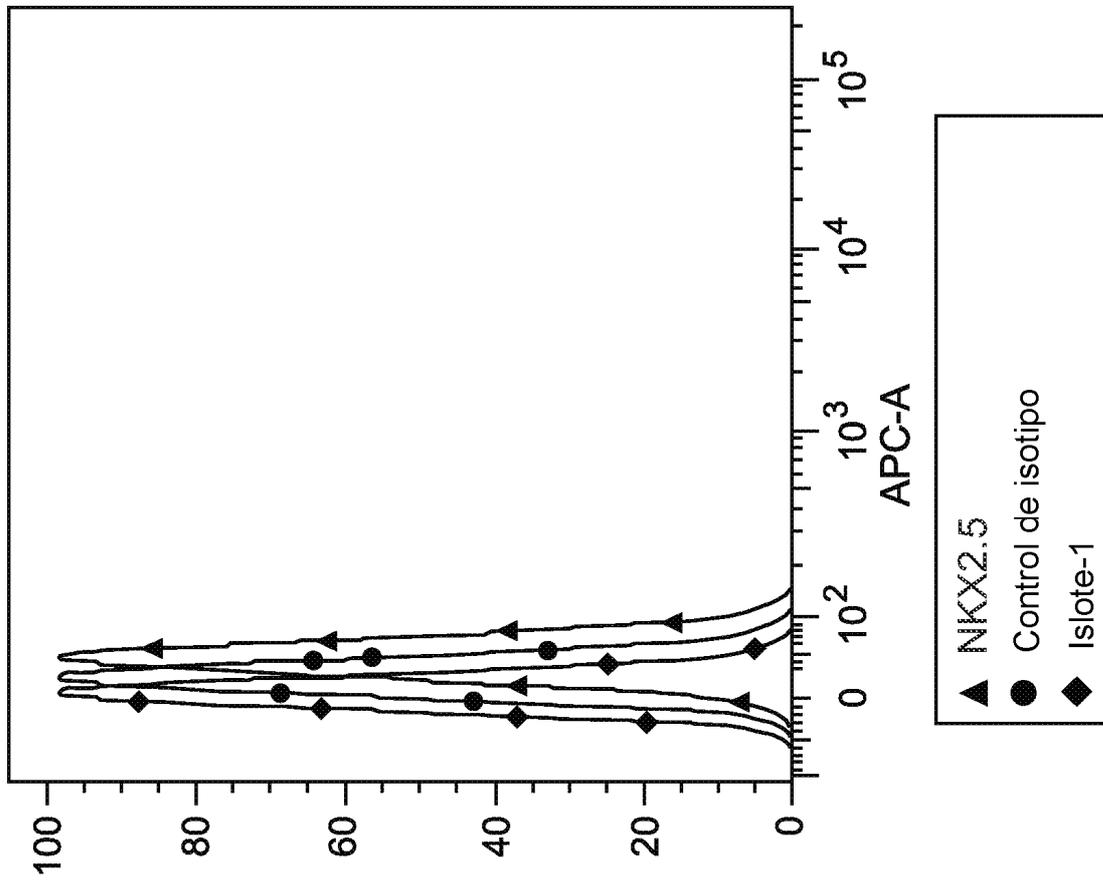
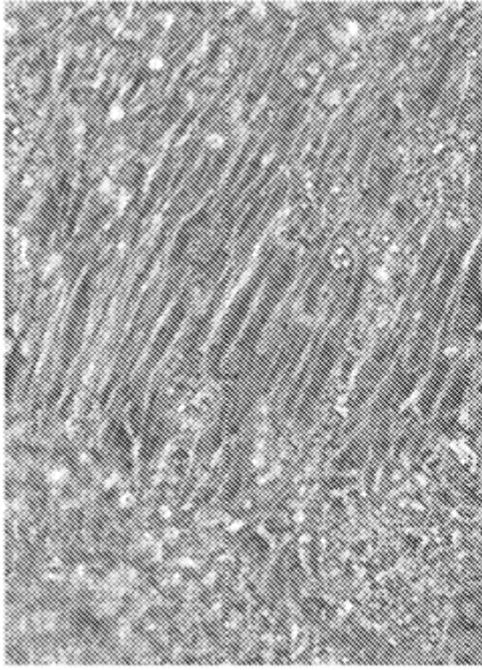
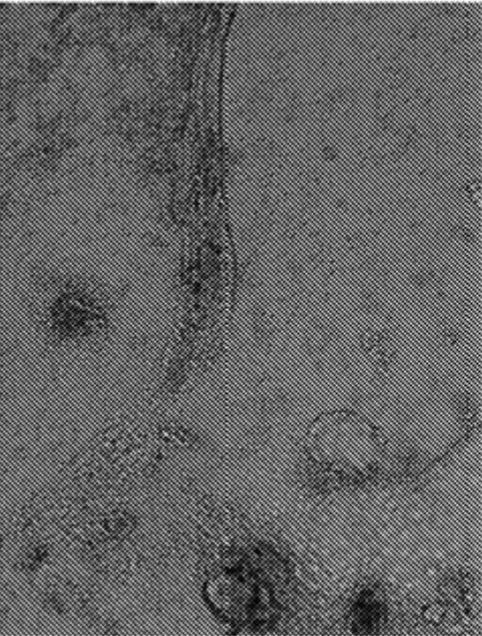


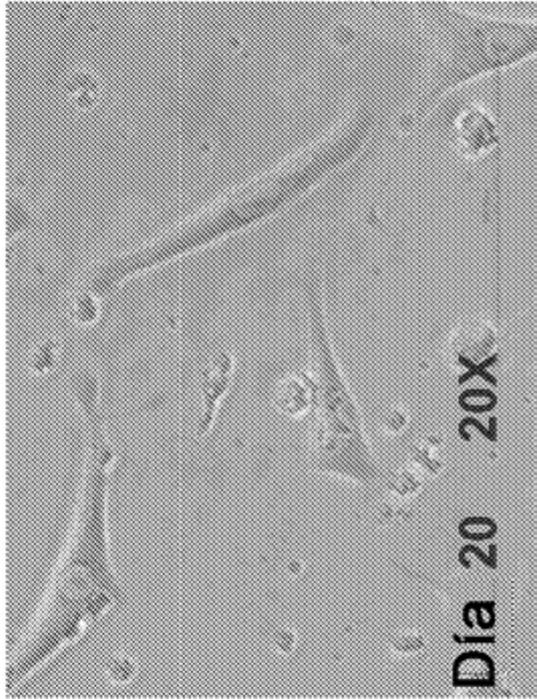
FIG. 5B



B



A



C

FIG. 6

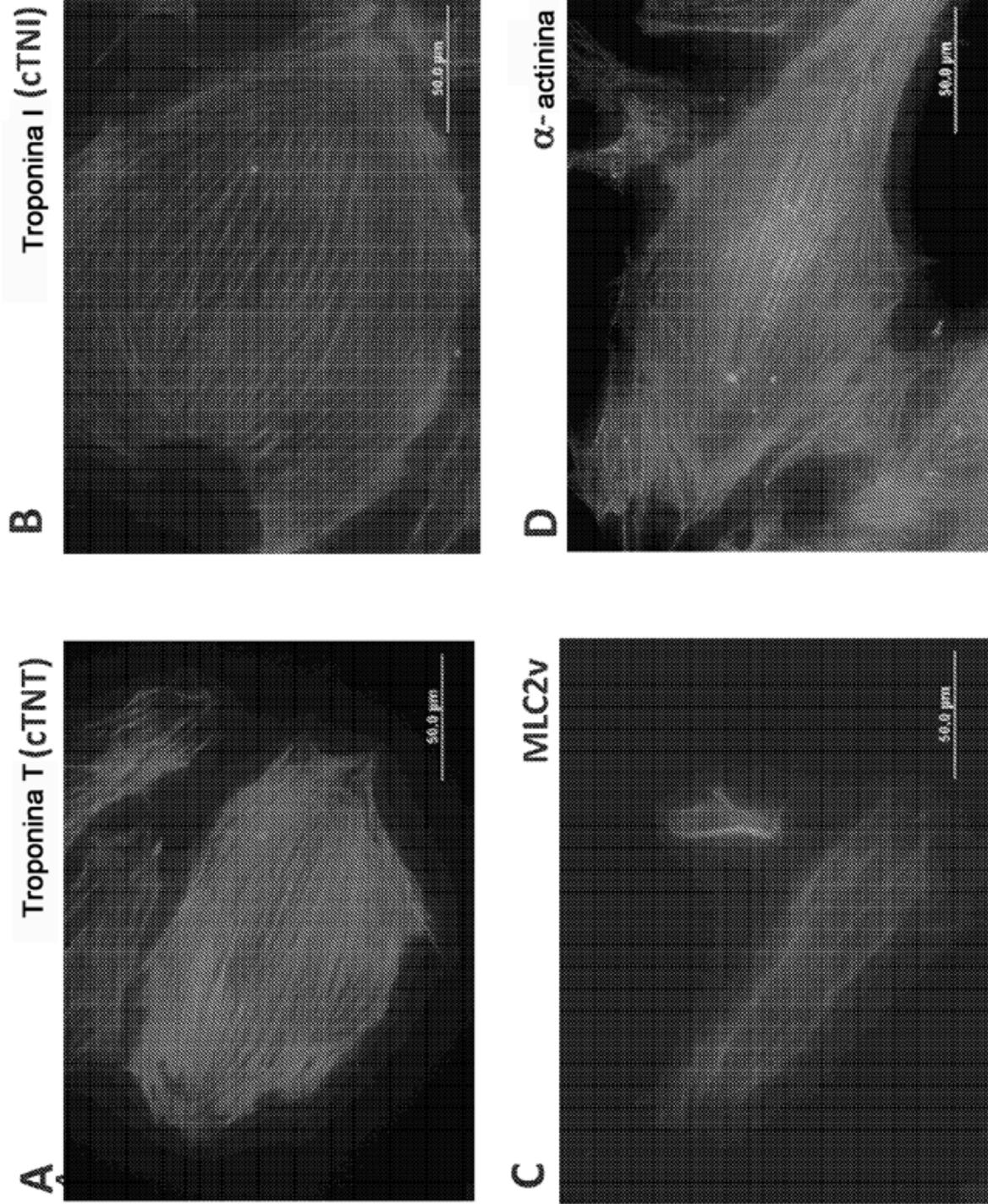


FIG. 7

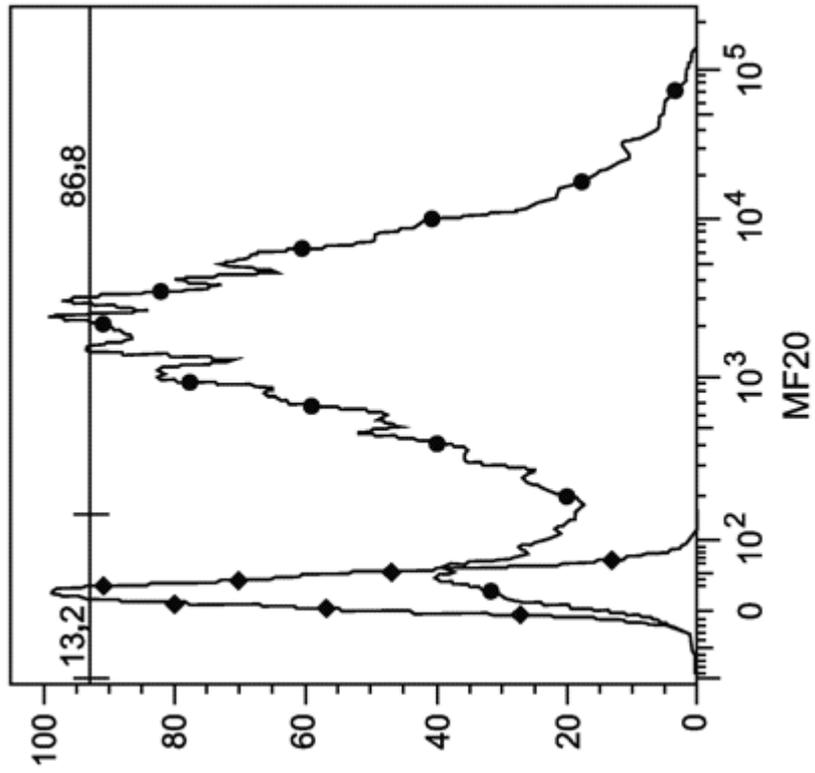


FIG. 8B

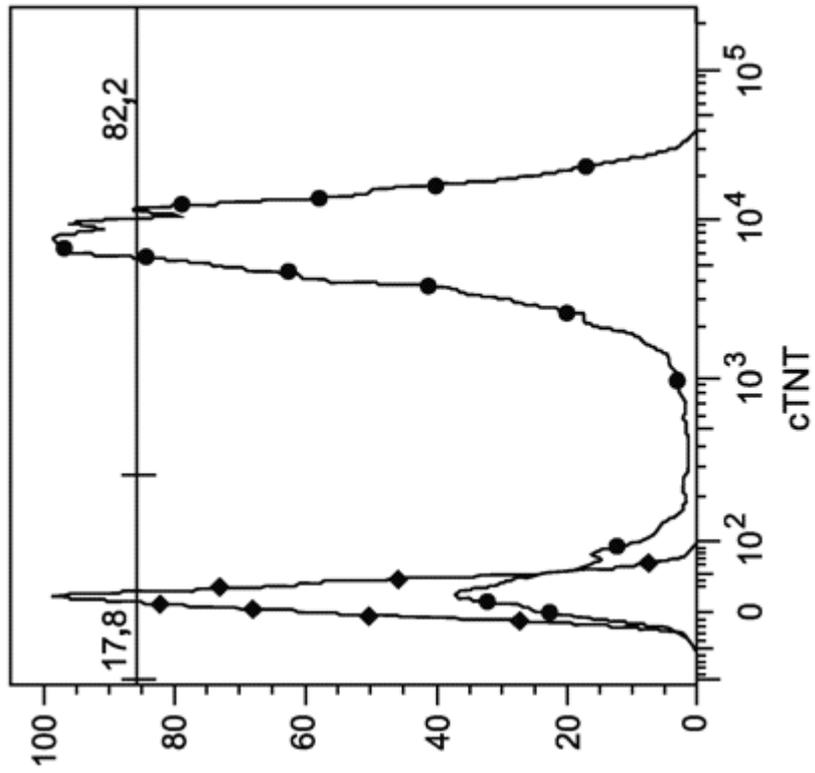


FIG. 8A

similares a las ventriculares similares a las nodales similares a las auriculares

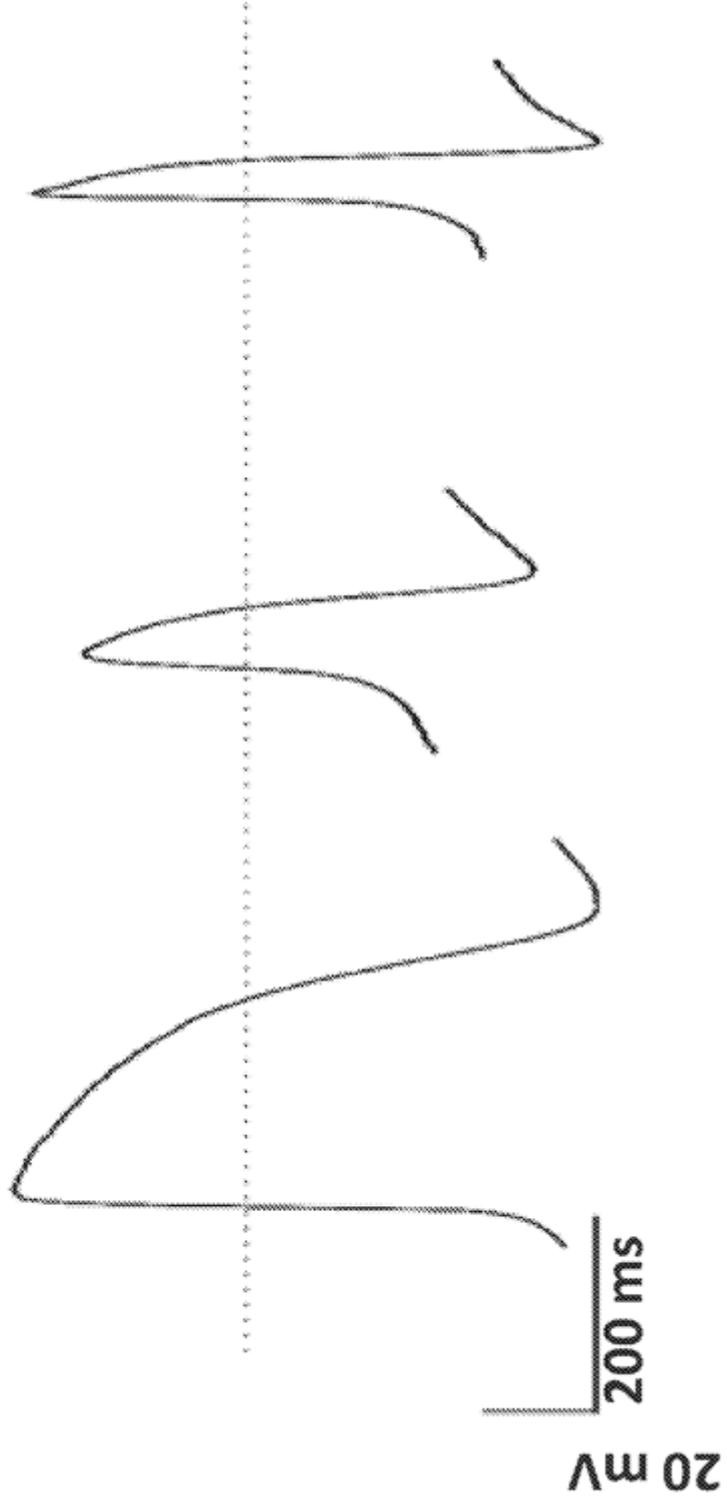
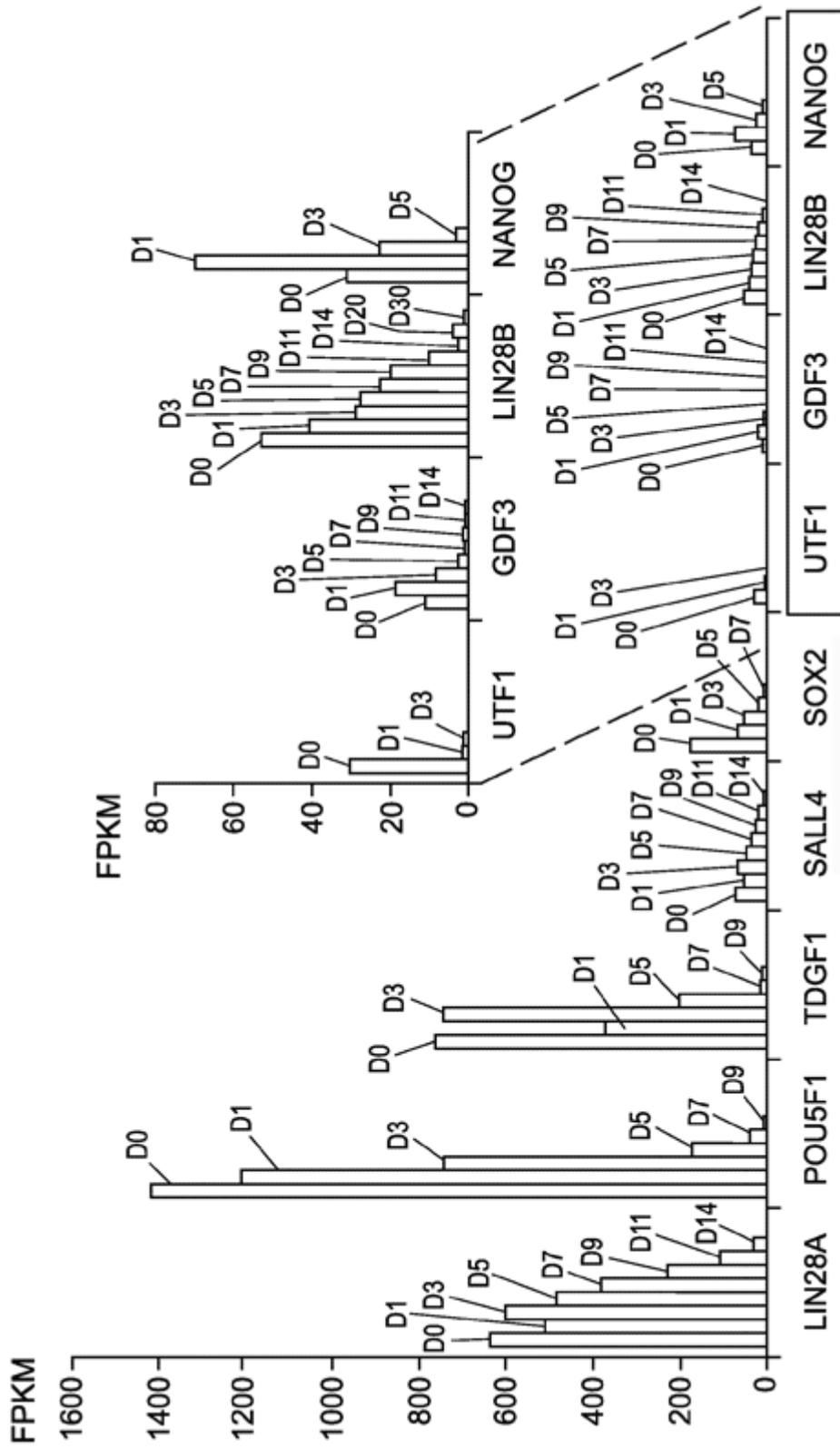
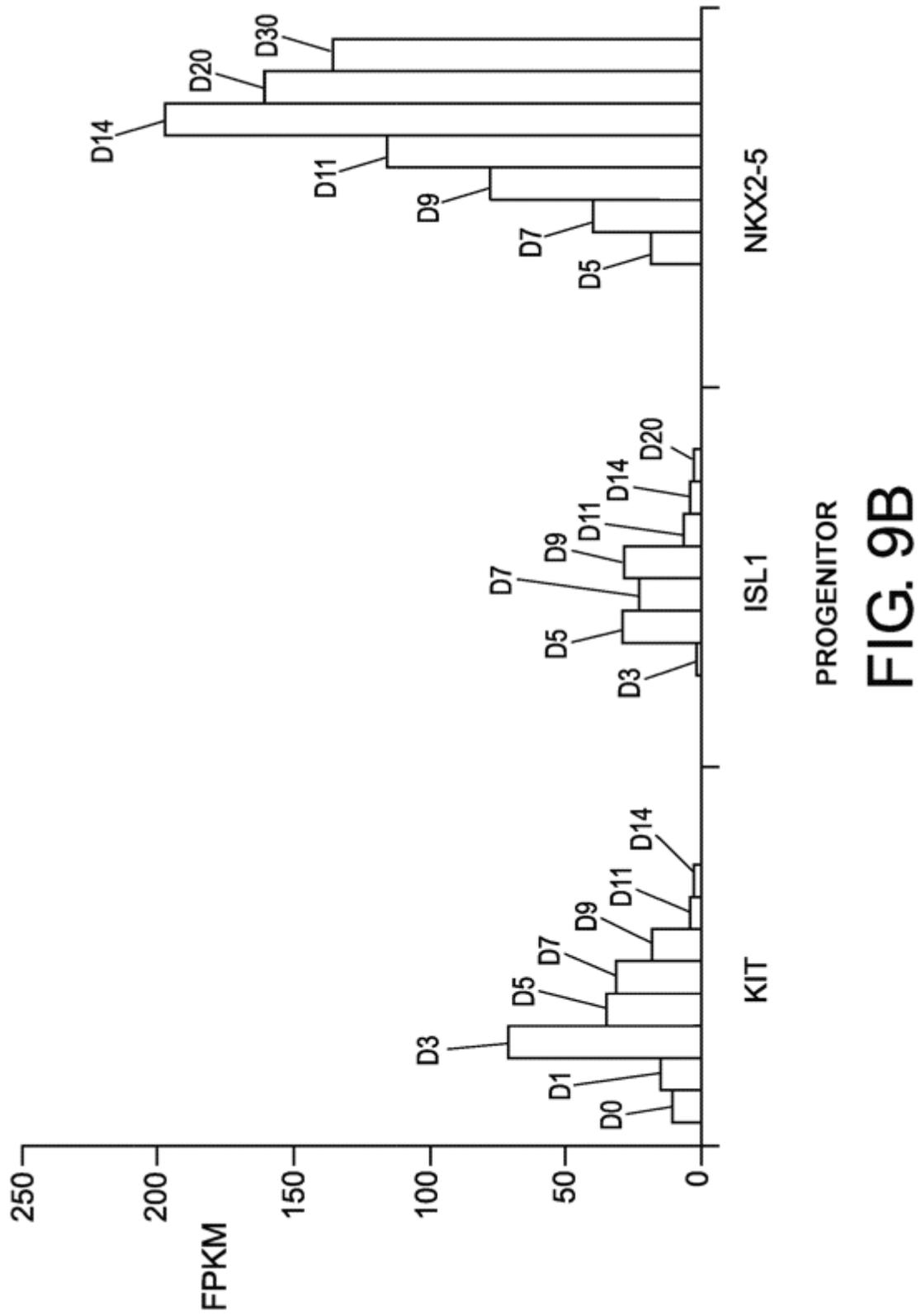


FIG. 8C



PLURIPOTENTE
FIG. 9A



PROGENITOR
FIG. 9B

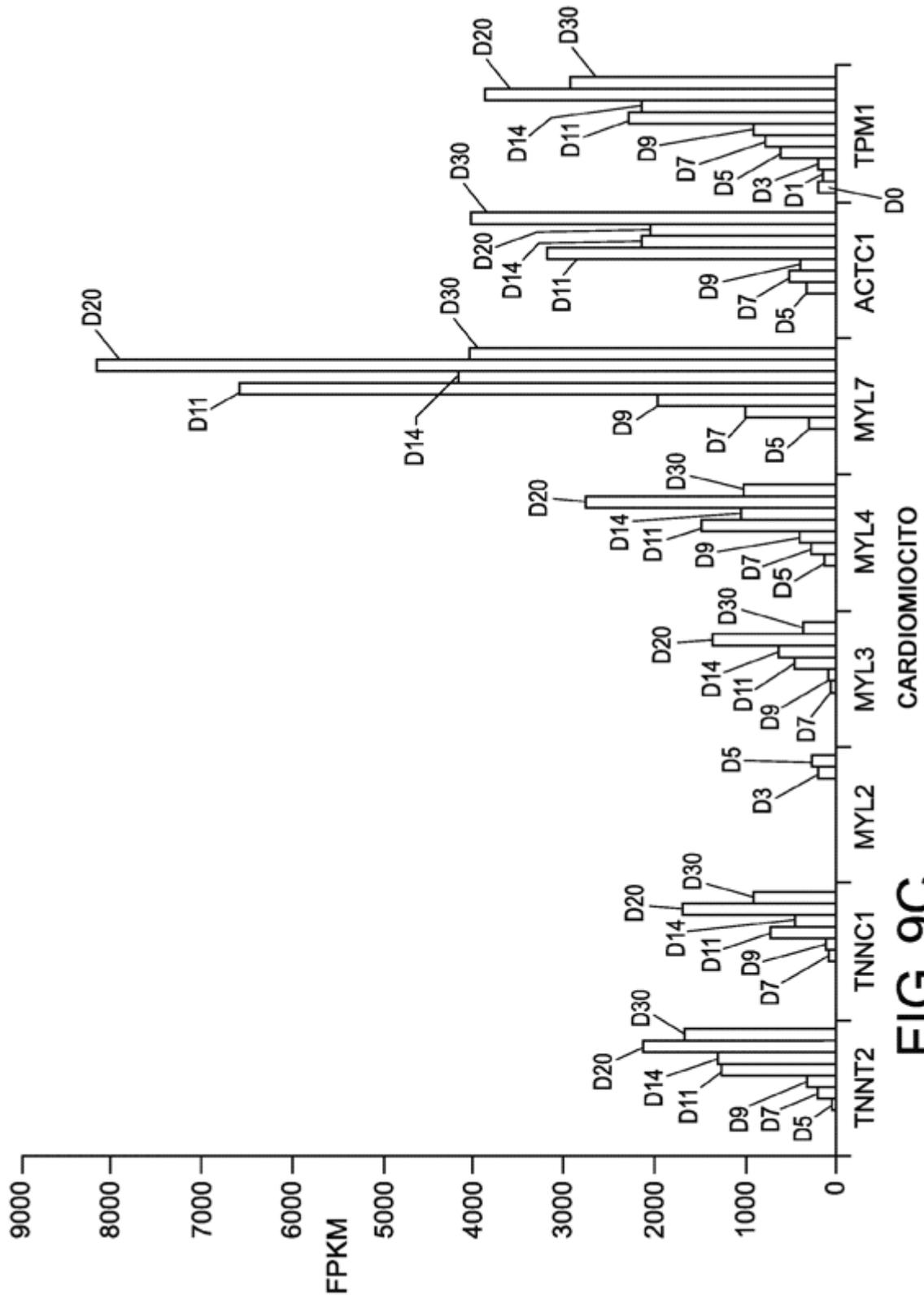


FIG. 9C