



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 340 650**

② Número de solicitud: 200802422

⑤ Int. Cl.:  
**C12N 5/075** (2000.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **13.08.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2010**

Fecha de la concesión: **18.04.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **03.05.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**03.05.2011**

⑰ Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 70%)  
**c/ Serrano, 117**  
**28006 Madrid, ES**  
**Universidad de Extremadura** (Titular al 10%) y  
**Universidad de Jaén** (Titular al 20%)

⑱ Inventor/es: **Pablo Dávila, Flora de; Bártulos Encinas, Óscar; Hernández Sánchez, Catalina y Aranega Jiménez, Amelia**

⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Uso de catecolamina para la diferenciación de células madre a cardiomiocitos.**

㉑ Resumen:

Uso de catecolamina para la diferenciación de células madre a cardiomiocitos.

La presente invención se refiere al uso de catecolamina para la diferenciación de células madre a cardiomiocitos y su maduración así como un método para la obtención y maduración de estas células cardíacas. Además, la catecolamina puede usarse para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un daño cardíaco.

ES 2 340 650 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Uso de catecolamina para la diferenciación de células madre a cardiomiocitos.

5 La presente invención se refiere al uso de catecolamina para la diferenciación de células madre a cardiomiocitos así como un método para la obtención de estas células cardíacas. Además, la catecolamina puede usarse para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un daño cardíaco.

**Estado de la técnica anterior**

10 Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de mortalidad en los países desarrollados, con 32% de las causas de muerte en España (Instituto Nacional de Estadística) y 2 millones anuales en la Unión Europea (Estadísticas de enfermedad cardiovascular 2008). Por otro lado, el 1% de los niños nacidos en nuestro país presenta alguna enfermedad congénita cardíaca. La alteración de un único gen tiene graves implicaciones en el desarrollo del corazón, así mutaciones en *GATA4*, son la causa de defectos en la septación de aurícula y ventrículo (Garg *et al.* 2003. *Nature*, 424: 443-447), mutaciones en *NKX2.5* además de los defectos citados en el caso de *GATA4* también tiene defectos en la conducción eléctrica (Schott *et al.*, (1998). *Science*, 281: 108-111). Mutaciones en *TBX5* son las causantes del Síndrome de Holt-Oram, el cual tiene unos defectos similares a las mutaciones en *NKX2.5* (Srivastava, 2006. *Cell* 126: 1037-1048).

20 La potencialidad de las células madre embrionarias en medicina regenerativa para la reparación y regeneración de tejidos y órganos vitales se ha puesto de manifiesto a lo largo de la última década (Narayan *et al.*, 2006. *Blood*, 107: 2180-2183; Klug *et al.*, 1996. *J Clin Invest.* 98: 216-224; Laflamme *et al.*, 2005. *Nat Biotechnol.* 23: 845-856; Ben-Hur y cols., 2004. *Stem Cells* 22: 1246-1255; Keirstad y cols., 2005. *J Neurosci.* 25, 4694-4705; Jiang *et al.*, 2007. *Cell Res.* 17: 333-344). El atractivo de estas células radica en la capacidad de diferenciarse a cualquier tipo celular. Sin embargo, la implantación de las mismas en condiciones indiferenciadas en corazones infartados (Laflamme y Murry, 2005. *Nat Biotechnol.* 23: 845-856) han reportado resultados inesperados como la aparición de teratomas. Se ha propuesto que un paso de diferenciación *in Vitro* entre células pluripotentes y cardiomiocitos diferenciados, evitaría estos efectos adversos (Laflamme *et al.*, 2007. *Am J Pathol*, 167: 663-671; Caspi *et al.* 2007. *J Am Coll Cardiol*, 50: 1884-1893).

30 Desde la primera vez que se aislaron las células madre de embriones preimplantados de ratón (Evans y Kaufman, 1981. *Nature.* 292: 154-156), se han establecido diversas líneas de células madre aunque no con todas se ha conseguido diferenciación a cardiomiocitos. El protocolo de diferenciación de las células madre embrionarias hacia un linaje cardíaco (Boeler *et al.*, 2002. *Circ Res.* 91: 189-201), pasa por la formación de estructuras tridimensionales, denominadas cuerpos embrionarios (EB), en los cuales se encuentran representadas los tres linajes embrionarios: ectodermo, endodermo y mesodermo. Las células cardíacas, de origen mesodérmico, se sitúan en el EB entre una capa superficial epitelial y una capa basal de células mesenquimales (Hescheler *et al.*, 1997. *Cardiovasc Res.* 36: 149-162). Dentro del EB, coexisten diferentes grados de diferenciación de cardiomiocitos. De esta forma, los cardiomiocitos menos diferenciados tendrían una forma redondeada, con miofibrillas desorganizadas y sus características serían similares a las células que constituyen el marcapasos del corazón. Los más diferenciados, tienen características similares a cardiomiocitos auriculares y ventriculares, y poseen miofibrillas altamente organizadas, observándose de forma definida las bandas Z, A e I que caracterizan a las sarcómeras de los miocardiocitos maduros (Hescheler *et al.*, 1997. *Cardiovasc Res.* 36: 149-162).

45 Uno de los problemas que surge en la diferenciación de células madre es el reducido número de cardiomiocitos obtenidos, siendo del 1-3% en el caso de células madre embrionarias de ratón, e inferiores al 1% en el caso de las humanas (Murry y Keller, 2008. *Cell*, 132: 661-680). Ésto supone un inconveniente a la hora de utilizar dichas células para tratamiento clínico de enfermedades cardíacas, si tenemos en cuenta que un infarto de miocardio puede llegar a matar hasta tres mil millones de las aproximadamente ocho mil quinientos millones de células que componen un corazón adulto (Sánchez y García-Sancho, 2007. *Cell Death Differ.* 14:1258-1261). Por tanto, la mejora en la eficiencia de diferenciación cardíaca supondría un gran avance en el éxito de la terapia regenerativa para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

55 Además de las células madre embrionarias se ha propuesto que el propio corazón adulto puede ser una fuente de precursores cardíacos con capacidad de diferenciación, y por tanto con potencial uso en medicina regenerativa.

A lo largo de la historia se ha pensado que las células del corazón adulto, al igual que las del cerebro no tenían capacidad de renovación. Sin embargo, mediante ensayos de proliferación y muerte celular se ha visto que en corazón de ratón el porcentaje diario de las células que se mueren es el mismo al de las células que proliferan (Sánchez y García-Sancho, 2007. *Cell Death Differ.* 14: 1258-1261). Esto supondría que las células del corazón adulto de ratón se renuevan por completo cada año, (Sánchez y García-Sancho, 2005. *Stem Cell Therapy and Tissue Engineering for Cardiovascular Repair.* Springer: New York, pp 121-134) y las del corazón adulto humano cada 5 años (Anversa *et al.*, 2006. *Circulation.* 113: 1451-1463). Diferentes poblaciones de progenitores cardíacos se han descrito. Así Urbanek *et al.*, 2006 describieron poblaciones de células con capacidad proliferativa ubicadas en nichos en el corazón, que se concentraban en la región auricular. Beltrami *et al.*, 2003, aislaron una población de progenitores cardíacos de rata adulta que expresan *c-kit*. Tras expandir esta población *In Vitro* y posterior inyección en corazón con isquemia aguda consiguieron diferenciación a células de músculo liso, endotelio vascular y cardiomiocitos. También se han descrito otras poblaciones de progenitores cardíacos que expresan genes como *Sca-1*, (Oh *et al.*, 2007. *PNAS*, 100: 12313-

## ES 2 340 650 B1

12318), o *islet-1*, (Cai *et al.*, 2003. *Dev Cell*. 5: 877-889). Estas últimas crecen en condiciones indiferenciadas *in Vitro*, pero se diferencian a cardiomiocitos cuando son cultivadas en presencia de los cardiomiocitos diferenciados (Laugwitz *et al.*, 2005. *Nature*. 433: 647-653).

5 A pesar de que estos progenitores presentes en corazones adultos proliferan y se diferencian en condiciones fisiológicas y cuando son cultivados *in Vitro*, no tienen capacidad de regeneración autónoma del parénquima cardíaco después de un daño cardíaco (Sánchez y García-Sancho, 2007. *Cell Death Differ*. 14: 1258-1261). Por tanto, tratamientos que estimulen las propiedades de proliferación y diferenciación de éstos precursores podrían estimular el potencial regenerativo del tejido cardíaco.

10 En este sentido, en la presente invención se presenta una solución al problema de la diferenciación de células madre a cardiomiocitos.

### Explicación de la invención

15 En la presente invención se demuestra cómo las catecolaminas son capaces de inducir la diferenciación de varias líneas de células madre embrionarias de ratón a cardiomiocitos. Además, se han realizado estudios de la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), primera enzima y paso limitante en la ruta de síntesis de las catecolaminas, detectándose ésta desde estadios previos al establecimiento de conexiones nerviosas en el embrión de pollo. Por tanto, la detección de la expresión de la TH en una región conocida como Hfr (del inglés *Heart forming region*, que corresponde a las células que van a formar el tubo cardíaco) en el embrión de pollo en gastrulación indica que el producto de esta reacción mediada por la TH, es decir, las catecolaminas, están implicadas en el desarrollo cardíaco mediante la diferenciación de células madre o progenitores cardíacos a cardiomiocitos.

25 En esta invención se demuestra que la L-DOPA y la dopamina inducen la expresión de proteínas contráctiles cardíacas como AMHC (miosina auricular de cadena pesada), VMHC (miosina ventricular de cadena pesada), y de factores de transcripción implicados en desarrollo cardíaco.

30 Las células madre embrionarias tienen un alto potencial en la medicina regenerativa porque son capaces, con las señales adecuadas, de diferenciarse a cualquier tipo celular, incluyendo cardiomiocitos. La aplicación de estas células en enfermedades cardiovasculares está siendo dificultada por la mezcla de poblaciones celulares que se originan en su diferenciación.

35 En este sentido, un primer aspecto de la presente invención consiste en el uso de catecolamina para la diferenciación de células madre a cardiomiocitos. En esta memoria el término diferenciación incluye la maduración de los progenitores cardíacos generados. Estos precursores incluyen tanto aquellos que son generados con el uso de catecolaminas como con cualquier otro método *in vitro* así como los que se generan de forma natural *in vivo*.

40 Las catecolaminas son un grupo de sustancias que incluye la dopamina, noradrenalina o adrenalina. En esta memoria, el precursor de dopamina, L-DOPA, se incluye como parte de este grupo a efectos de unificar la referencia a su acción de diferenciación. Las 3 catecolaminas citadas tienen la estructura distintiva de un anillo de benceno, con dos grupos hidroxilos, una cadena intermedia y un grupo amino terminal, a esta estructura se le llama catecol y es lo que da nombre a la familia.

45 Las catecolaminas se producen principalmente en las células cromafines de la médula adrenal y en las fibras postganglionares del sistema nervioso simpático. La tirosina hidroxilasa se encuentra en todas las células que sintetizan catecolaminas. La TH es una oxidasa de acción combinada que usa el oxígeno molecular y tirosina como sustratos y bipterina como cofactor. Cataliza la adición de un grupo hidroxilo a la meta posición de la tirosina, formando de esta manera 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA). La siguiente reacción está catalizada por la aminoácido aromático descarboxilasa, que pasa L-DOPA a dopamina. Necesita piridoxal fosfato. El paso de dopamina a noradrenalina es catalizado por la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, a partir de ascorbato y oxígeno. Por último, para que la noradrenalina pase a adrenalina se usa feniletanolamina N-metiltransferasa, que transfiere un grupo metilo de un donador (S-*adonosilmetionina*) hasta la adrenalina formante.

55 En este sentido, una sobreexpresión de la enzima TH o su aplicación exógena a células madre o células precursoras cardíacas favorecería la diferenciación de células madre a cardiomiocitos ya que los productos de su acción enzimática, L-DOPA de forma directa y dopamina de forma indirecta, están implicados, tal como se demuestra en esta invención, en la citada diferenciación. Asimismo, el uso de agonistas de la TH podría producir el mismo efecto de diferenciación de células madre a cardiomiocitos.

60 El término "cardiomiocito" se refiere a células del miocardio o músculo cardíaco capaces de contraerse de forma espontánea e individual.

65 Los cardiomiocitos pueden ser generados a partir de diferentes tipos celulares, entre los que se encuentran: células madre embrionarias, células mononucleares seleccionadas a partir de extracción de médula ósea o de sangre, sin excluir cualquier otro tipo de célula indiferenciada, células progenitoras cardíacas y células musculares esqueléticas.

## ES 2 340 650 B1

En esta invención una célula madre es una célula indiferenciada que, mediante una división asimétrica, da lugar a una célula hija que continúa dividiéndose, manteniendo la característica de renovación, y a otra célula hija que continúa la vía de diferenciación para la que está programada y, por lo tanto, puede producir uno o más tejidos maduros, funcionales y plenamente diferenciados. Dentro de las células madre se pueden distinguir diferentes categorías según su origen y grado de potencialidad. Así, están las células madre totipotentes (puede crecer y formar un organismo completo), las células madre pluripotentes (puede formar cualquier tipo de célula proveniente de los tres linajes embrionarios; endodermo, ectodermo y mesodermo), las células madre multipotentes (solo pueden generar células de su propia capa o linaje embrionario de origen), o células precursoras (pueden formar únicamente un tipo de célula particular). Las células madre embrionarias son del tipo de células madre pluripotentes, forman parte de la masa celular interna de un embrión de pocos días de edad y tienen la capacidad de formar todos los tipos celulares de un organismo adulto.

Como se ha citado anteriormente, en esta memoria, el término diferenciación incluye el proceso de maduración de los cardiomiocitos. La maduración está caracterizada por la adquisición de proteínas contráctiles como actina, miosina, troponina y tropomiosina, que forman la unidad estructural del cardiomiocito funcional, el sarcómero, y les confieren la capacidad de contracción autónoma. En la presente invención se demuestra cómo el precursor de catecolaminas, L-DOPA, desempeña un papel importante en la maduración de los cardiomiocitos, dado que produce un aumento en la expresión de algunas de las proteínas contráctiles. Para demostrar este importante papel en su maduración, se realiza una RT-PCR cuantitativa utilizando el ARN de células cuyo tratamiento se llevó a cabo una vez las células de los cuerpos embrionarios ya habían empezado a latir. Se emplearon los cebadores correspondientes a proteínas contráctiles y se observó, tal como se indica en el ejemplo 7, un aumento significativo de las miosinas de cadena pesada ( $\beta$ -MHC y  $\alpha$  MHC) así como de cadena ligera (MLC2A y MLC2V), y también de la actina cardiaca ( $\alpha$ -actina) y la troponina cardiaca T2. Tal como se explica más claramente en la parte final de este apartado, (explicación de la invención), estas proteínas están relacionadas directamente con la formación de cardiomiocitos y con su maduración.

Una posible aplicación de estos cardiomiocitos es su trasplante para la compensación de una pérdida de células cardíacas, después de un evento isquémico o degenerativo. El trasplante de cardiomiocitos inmaduros puede tener efectos secundarios indeseados tales como las arritmias.

En una realización preferida, la catecolamina se selecciona del grupo que comprende: L-DOPA, dopamina, cualquiera de sus sales, análogos o cualquier combinación de las anteriores.

Por "sales" de catecolamina se entienden las sales de ácidos orgánicos o inorgánicos, principalmente sales de ácido clorhídrico o de bitartrato, sin limitarse a estas en exclusiva.

El término "análogos" se refiere a productos químicos con una estrecha relación estructural con el compuesto original, catecolamina. Comprende compuestos que se parecen estructuralmente a los compuestos naturales, pero se han reemplazado uno o más átomos en la estructura por otros. Estos análogos mantienen la misma función que la catecolamina original.

En otra realización preferida, las células madre embrionarias pertenecen a ratón.

En varias realizaciones preferidas de la anterior realización, las células madre embrionarias pertenecen a la línea celular E14 (E14Tg2a.IV) o a la línea celular HM1, ambas líneas celulares son de ratón.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de catecolamina para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un daño cardíaco mediante la diferenciación de células progenitoras cardíacas a cardiomiocitos.

Las células progenitoras cardíacas presentes en corazones adultos proliferan y se diferencian en condiciones fisiológicas y cuando son cultivadas *in vitro* pero, no tienen capacidad de regeneración autónoma del parénquima cardíaco después de un daño cardíaco. Con esta invención se estimulan las propiedades de proliferación y diferenciación de éstos precursores que favorecen la regeneración del tejido cardíaco.

Se entiende por daño cardíaco la afección de la funcionalidad de las células del músculo cardíaco en su capacidad de contracción y regeneración motivadas ambas por la diabetes, la obesidad, el estrés, el tabaquismo, la hipertensión, factores hereditarios, condiciones ambientales extremas, interrupción en el riego sanguíneo arterial, u otros factores no mencionados.

El tratamiento del daño cardíaco referido en este aspecto de la invención se lleva a cabo mediante la administración de un medicamento que contiene en su composición, al menos, catecolamina, para favorecer la diferenciación de células progenitoras cardíacas a cardiomiocitos.

El siguiente aspecto de la presente invención es un método para la diferenciación de células madre a cardiomiocitos que comprende:

- a. cultivar una línea de células madre en un medio de cultivo de diferenciación.

## ES 2 340 650 B1

El medio de diferenciación es un medio de crecimiento suplementado con compuestos de diversa naturaleza que permiten la diferenciación de las células madre. Este medio de diferenciación puede estar compuesto por medio de crecimiento (por ejemplo, DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), L-glutamina, piruvato, glucosa, suero de uso regular, glutamina, aminoácidos no esenciales y 2-mercaptoetanol (tal como se especifica en el ejemplo 2.1.1).

5 También puede estar compuesto del medio de crecimiento suplementado con 3-isobutil-1-metilxantina, dexametasona e insulina. Otros ejemplos de medios de diferenciación son medio MEM (*Modified Eagle Medium*) con el suplemento B-27 (Gibco-BRL) y, el medio consistente en la mezcla a partes iguales de F12 (Gibco-BRL) y MEM (Gibco-BRL), suplementado con insulina, transferrina, putrescina, progesterona, selenio, glucosa y albúmina bovina sérica (BSA). Los medios de diferenciación citados en este apartado no limitan el uso de medios con otras composiciones que puedan ser utilizadas para llevar a cabo este método de diferenciación de células madre a cardiomiocitos.

b. adicionar catecolamina al medio de diferenciación en el que se encuentran las células del paso anterior (a).

15 En esta invención se consigue aumentar la diferenciación de células madre en células cardíacas por medio de la adición de catecolamina al medio de diferenciación descrito en el paso anterior.

c. renovar periódicamente el medio de cultivo de diferenciación con catecolamina, definido en el paso anterior (b).

20

El término “periódicamente” hace referencia a un periodo definido por el tiempo máximo que el medio de diferenciación con la catecolamina o catecolaminas mantiene las propiedades físico-químicas de cada uno de los componentes incluida la catecolamina, que permiten la diferenciación de las células madre en cardiomiocitos.

25

d. recolectar los cardiomiocitos generados en el paso (c).

Los cardiomiocitos generados por medio de este método podrían ser usados en el campo de la medicina regenerativa. La medicina regenerativa permite reparar los tejidos dañados utilizando mecanismos análogos a los que de forma natural usa el organismo para la renovación de las poblaciones celulares. Los mecanismos que posee el organismo de regeneración, reparación y renovación de tejidos son limitados. De esta manera, la muerte de grandes cantidades de tejido de manera aguda (por ejemplo en los infartos de miocardio), no son susceptibles de ser reparados por los mecanismos naturales del organismo. Las nuevas terapias de trasplante desarrolladas en los últimos años permitirán trasplantar las células cardíacas o cardiomiocitos que se generen por medio de los métodos recogidos en esta invención, lo que supondría la posibilidad para el tratamiento de este tipo de daño cardíaco.

En una realización preferida, las células madre del método anterior son células madre embrionarias. En este caso, el método comprende los siguientes pasos:

40

a. cultivar una línea celular en un medio de cultivo de diferenciación para obtener cuerpos embrionarios.

El término “cuerpos embrionarios” hace referencia a una estructura esférica que forman espontáneamente las células madre cuando se cultivan en suspensión, técnica denominada de gota colgante, que se menciona en el ejemplo 1 de la presente invención. Esta técnica impide la adhesión de las células a la placa y permite que se agreguen entre sí.

45

b. recolectar los cuerpos embrionarios obtenidos en el paso anterior (a).

50

La recolección de los cuerpos embrionarios contenidos en las gotas colgantes, según el ejemplo 2 de la presente invención, puede realizarse por ejemplo con una pipeta y, a continuación se depositan en un pocillo de una placa para realizar el tratamiento del paso (c).

55

c. adicionar catecolamina al medio de diferenciación donde se encuentran los cuerpos embrionarios obtenidos en el paso anterior (b),

d. renovar periódicamente el medio de cultivo de diferenciación con catecolamina, definido en el paso anterior (b),

60

e. recolectar los cardiomiocitos generados en (d).

Los cardiomiocitos generados por este método, tal como se ha mencionado en un párrafo precedente podrían ser usados en el campo de la medicina regenerativa.

65

En otras realizaciones preferidas, en el método de diferenciación se emplean células madre embrionarias pertenecientes a la línea celular E14 (E14Tg2a.IV) o de la línea celular HM1, ambas líneas celulares de ratón.

## ES 2 340 650 B1

Otra realización preferida hace referencia a un método donde la catecolamina se selecciona del grupo que comprende: L-DOPA, dopamina, cualquiera de sus sales, análogos o cualquier combinación de las anteriores.

Según otra realización preferida, la concentración de L-DOPA y/o dopamina adicionada en el medio de diferenciación donde se encuentran los cuerpos embrionarios es de entre 1 y 50  $\mu\text{M}$ .

En una realización más preferida, la concentración de L-DOPA y/o dopamina es de entre 5 y 25  $\mu\text{M}$ .

La adición de catecolamina a un medio de cultivo, medio de diferenciación definido anteriormente, conteniendo células madre, produce un aumento en la expresión de marcadores cardíacos. Se entienden por marcadores cardíacos; factores de transcripción y proteínas contráctiles.

Tal como se describe en los ejemplos de esta invención, esta inducción de factores de transcripción y proteínas contráctiles, se produce por la adición de L-DOPA y/o dopamina a un medio de cultivo en el que se diferencian células madre embrionarias, en el caso de las células embrionarias de ratón E14, se observó un aumento de los factores de transcripción NKX2.5, GATA4, TBX5, TBX2. La especificación del linaje cardíaco a partir de precursores de origen mesodérmico se produce por la expresión de un conjunto de factores de transcripción (NKX2.5, MEF2, GATA, TBX y HAD) conservados a lo largo de la evolución. Estos factores de transcripción controlan el destino de los precursores cardíacos, la expresión de proteínas contráctiles y la morfogénesis de estructuras cardíacas. Su importancia se ha puesto de manifiesto por la implicación de mutaciones en estos genes en la aparición de defectos cardíacos como se describe en el apartado de Estado de la técnica anterior.

La adición de L-DOPA o dopamina a los cuerpos embrionarios también dio lugar a un aumento en los niveles de expresión de las proteínas contráctiles miosina alfa de cadena pesada ( $\alpha$  MHC) así como de la troponina cardíaca T2 (TT2).

En el caso de células embrionarias de ratón de la línea HM1 que ya habían comenzado a latir, se observó un aumento del factor de transcripción TBX5 y de las miosinas de cadena pesada ( $\beta$ -MHC y  $\alpha$  MHC), así como de cadena ligera (MLC2A y MLC2V), y también de la actina cardíaca ( $\alpha$ -actina) y la troponina cardíaca T2 al aplicar L-DOPA.

La adquisición de proteínas contráctiles como actina, miosina, troponina y tropomiosina, que forman el sarcómero y confieren la capacidad de contracción autónoma al cardiomiocito, supone una progresión en la maduración del precursor miocárdico a miocardio maduro.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### Descripción de las figuras

Fig 1. Muestra el efecto de L-DOPA y dopamina en la diferenciación de la línea de células madre embrionarias E14 a cardiomiocitos.

Los cuerpos embrionarios formados por las células E14 se cultivaron sobre superficie adherente durante 5 días en presencia o ausencia de 10  $\mu\text{M}$  L-DOPA o 10  $\mu\text{M}$  de dopamina. Al final del cultivo, todos los cuerpos embrionarios cultivados en las mismas condiciones se procesaron conjuntamente para extraer ARN. La expresión génica se analizó por RT-PCR cuantitativa. Los datos se expresan como la media más el error estándar de tres experimentos. C, control; DA, dopamina; L-DOPA.

Fig 2. Muestra el efecto de L-DOPA en la diferenciación de la línea de células madre embrionarias HM1 a cardiomiocitos.

Los cuerpos embrionarios formados por las células HM1 se cultivaron sobre superficie adherente durante 7 días en medio control y adicionalmente por otros 7 días en presencia o ausencia de 10  $\mu\text{M}$  L-DOPA. Al final del cultivo, se diseccionaron los *foci* de latido y se procesaron para extraer ARN. La expresión génica se analizó por RT-PCR cuantitativa. Los datos están expresados respecto al control que se normalizó a 1.

Fig 3. Muestra la expresión de la tirosina hidroxilasa (TH) en el embrión de pollo por RT-PCR cuantitativa.

La TH se detecta mediante esta técnica desde estadio embrionario 4 (st) 4, alcanzándose un pico de expresión en st 8. La expresión de la misma es detectada en el Hfr (*Heart formation region*) de st 5, manteniéndose su expresión en tubos endocárdicos de embrión de 3 somitas (TE, 3S) y alcanzándose un pico de expresión en asa cardíaca (AC) del embrión de st 10.

## ES 2 340 650 B1

Fig 4. Muestra el patrón de expresión de la *TH* por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica.

La *TH* es detectada por hibridación *in situ* desde st 8 (5-6 somitas), restringiéndose la expresión de la misma a los tubos endocárdicos. Mediante inmunohistoquímica, se aprecia el inicio de la expresión de la enzima en los tubos endocárdicos de st 9 (F-J). AC, asa cardíaca; TE, tubos endocárdicos.

Fig 5. Muestra la inducción de marcadores cardíacos por *L-DOPA* y dopamina.

Utilizando microesferas acrílicas de heparina recubiertas de *L-DOPA* (B y C) o dopamina (D-F) se observa la inducción de marcadores cardíacos como VMHC1 (miosina de cadena pesada de ventrículo) (B y E) o AMHC1 (miosina de cadena pesada de aurícula) (C y F). También se observa la inducción del factor de transcripción TBX5 (D). En A se muestra la posición y estadio embrionario en el que se colocaron las microesferas (\*). El rectángulo indica la posición del Hfr.

Fig 6. Muestra la inhibición de la expresión de marcadores cardíacos mediante el uso de inhibidores de la ruta de biosíntesis de catecolaminas.

Microesferas impregnadas con 3-I-Tyr, inhibidor de la síntesis de *L-DOPA* (A) o con mHBH, inhibidor de la síntesis de dopamina (B-D). Ambos inhibidores bloquean la expresión de los marcadores cardíacos estructurales VMHC1 (A y C) y AMHC1 (D). Sin embargo, la expresión del factor de transcripción TBX5 no se ve alterada por mHBH (B).

Fig 7. Muestra el efecto de la *TH* exógena en la expresión de marcadores cardíacos.

Los embriones de pollo fueron electroporados en st 3 y st 3+ en la línea primitiva, región por la que ingresan las células que dan lugar al mesodermo cardíaco y por ende al corazón. Para ello se utilizó un vector bicistrónico que contiene el ADNc de la proteína verde fluorescente (GFP) y el ADNc de la *TH* de pollo. A, B, D y E corresponden a embriones electroporados. C y F, embriones controles, no electroporados. A y D expresión de GFP que nos indica que las células que han sido electroporadas. La sobre-expresión de *TH* induce la expresión de las proteínas contráctiles AMHC (B) y VMHC (E) respecto a los controles (C y F).

### 35 Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen el uso de las catecolaminas para la diferenciación de células madre en cardiomiocitos y la maduración de los progenitores cardíacos.

#### Ejemplo 1

##### Mantenimiento en cultivo en condiciones indiferenciadas de las ESC (del inglés *Embryonic Stem Cells*)

###### 1.1.- Cultivo de la línea celular E14Tg2a.IV (E14)

La línea de células madre embrionarias de ratón E14 se mantiene en condiciones indiferenciadas cultivándolas en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> recubiertas de gelatina a 37°C de temperatura y 5% CO<sub>2</sub>. Para preparar las botellas de cultivo, éstas se incuban con una solución de 0,1% gelatina (Sigma, USA) en DPBS (Dulbecco PBS) (Invitrogen, USA) a 37°C durante al menos 5 minutos. Transcurrido este tiempo se elimina el exceso de gelatina y se dejan secar en el incubador durante 5 minutos.

Las células se dividen a una dilución 1:8 cada dos días, para ello se lavan con 3 ml de DPBS y se levantan de la superficie de cultivo incubando con 1 ml 0.05% de tripsina-EDTA (Invitrogen) a 37°C durante 5 minutos. A continuación se detiene la acción de la tripsina añadiendo 4 ml de medio de proliferación. Las células se centrifugan a 1000 rpm durante 4 minutos, y el precipitado celular obtenido se resuspende en medio proliferativo. El medio proliferativo está compuesto por DMEM con glutamina, piruvato, 4,5 g/l de glucosa, suplementado con 1% glutamina, 1% aminoácidos no esenciales, 0,1% 2-mercaptoetanol, 1% penicilina/estreptomina y 10% suero fetal de ternera (FCS) (especial para células madre embrionarias) (todo de Invitrogen). El estado indiferenciado se mantuvo añadiendo 10<sup>6</sup> unidades de ESGRO® LIF (del inglés Leukaemia Inhibitor Factor) (Chemicon, USA) por litro de medio de cultivo.

La línea E14 fue cedida amablemente por la Dra. Deborah Henderson.

## ES 2 340 650 B1

### 1.2.- Cultivo de la línea celular HM1

La línea de células madre embrionarias de ratón HM1 se cultiva en estado indiferenciado sobre una capa de células nutricias, compuesta por fibroblastos embrionarios de ratón amitóticos (MEF). Las HM1 se mantienen en medio con 15% FBS (Tabla 1).

TABLA 1

Composición de los medios de cultivo para MEF y medio con 15% FBS utilizado para el cultivo de la línea celular HM1

	Medio MEF	Medio 15% FBS
<b>DMEM</b>	85 ml	71.5 ml
<b>FBS</b>		15 ml (15%)
<b>CS</b>	10 ml (10%)	
<b>Bicarbonato sódico (7.5%)</b>	2 ml (0.15%)	
<b>MEM non essential aa's (100x)</b>	1 ml (1x)	1 ml (1x)
<b>Penic./Estrept. (10<sup>4</sup> U/ml)</b>	0.5 ml (50 U/ml)	0.5 ml (50 U/ml)
<b>L- Glutamina (200 mM)</b>	1 ml (2 mM)	1 ml (2 mM)
<b>β-mercaptoetanol (10 mM)</b>		1 ml (0.1 mM)
<b>Mitomicina C (2 mg/ml)</b>	0.5 ml (10 µg/ml)	

#### 1.2.1.- Obtención de cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de ratón

Se extraen embriones de ratón 13,5-15,5 días de desarrollo embrionario, (E13,5-15,5) y se colocan en PBS estéril. Se evisceran (se eliminan la cabeza y vísceras) y nos quedamos con las carcasas. Se elimina el PBS y se ponen 2 ml de tripsina por embrión, se cortan con un bisturí y se pasan por una pipeta p10 o p20 varias veces. Se incuban a 37°C 15 min. Se Añade 5 ml más de tripsina para seguir disgregando y se vuelven a incubar otros 10 min. a 37°C y se vuelven a disgregar pipeteando. Se añade 20 ml de medio MEF (ver Tabla 1), para inhibir la tripsina. El disgregado celular se pasa a un tubo cónico, se deja decantar unos segundos y el sobrenadante se pasa a un tubo falcon de 30 ml. Se centrifuga el sobrenadante 5 min. a 1000 rpm. El precipitado celular se resuspende en 10 ml de medio MEF por embrión. Se siembran 10 ml de la suspensión celular por placa de 100 mm en medio MEF. Se cambia el medio al día siguiente. Se mantiene el cultivo a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

#### 1.2.2.- Preparación de fibroblastos embrionarios amitóticos

Una vez que los fibroblastos embrionarios se encuentran próximos a la confluencia, se procesan para que se vuelvan amitóticos y puedan servir como monocapa sobre la que se cultivan las ESC. Para ello se sustituye el medio de cultivo MEF por 5 ml de medio MEF + Mitomicina C, y se incuban los fibroblastos entre 2 y 3 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se desecha el medio y se lavan las células 3 veces con PBS. Después se levantan de la placa de cultivo con

## ES 2 340 650 B1

2,5 ml de tripsina-EDTA incubando entre 1 y 5 minutos a 37°C. A continuación se detiene la acción de la tripsina añadiendo 8 ml de medio MEF. Las células se despegan pipeteando varias veces, teniendo cuidado de no generar burbujas, se recogen y se depositan en un tubo de fondo cónico para poder centrifugarlas durante 5 minutos a 160 g. Pasado este tiempo se desecha el sobrenadante y se resuspenden las células en 10 ml de medio más 10% de suero de ternera. Entonces se realiza un recuento celular. Para obtener la monocapa de fibroblastos amitóticos sobre las cuales crecen las células madre embrionarias de ratón, se siembra un número determinado de fibroblastos amitóticos ( $10^6$  -  $1,2 \times 10^6$  y 4 ml de medio en placa de 60 mm,  $3,4 \times 10^5$  y 2 ml de medio en placa de 35 mm,  $10^5$  y 0,5 ml de medio en placa de 10 mm) sobre placas adherentes y tratadas con 0,1% gelatina.

10

### Ejemplo 2

#### *Diferenciación de las ESC a cardiomiocitos*

15 La diferenciación de células madre embrionarias se logra usando medio de diferenciación y cultivando las células en placas bacteriológicas de 100 mm de diámetro mediante una variación del método de gota colgante descrito por Wobus (Wobus *et al.*, 1991. *Differentiation*, 48: 173-182). Dicho procedimiento permite la agregación de las células madre embrionarias para formar los denominados cuerpos embrionarios (EB, del inglés *embryonic bodies*) simples.

20 Tanto la línea celular E14 como la HM1 se diferencian mediante este método con ligeras diferencias que se describen a continuación.

#### 2.1- Diferenciación de las E14

25

##### 2.1.1.- Disposición de las células en gotas colgantes. (Día 0)

Las células indiferenciadas se lavan con DPBS, se despegan de la placa de cultivo con tripsina, y se centrifugan para eliminar la tripsina. Se elimina el sobrenadante, y el precipitado celular obtenido se resuspende en medio de diferenciación. Se realiza un recuento del número de células. Se prepara una suspensión celular de  $1,5 \times 10^4$  células/ml en medio de diferenciación. Se siembran 10-15 ml de la suspensión celular una placa Petri de bacterias, para evitar que las células se adhieran a la superficie de la placa. A partir de esta suspensión celular se siembran gotas de 20  $\mu$ l (300 células/gota), utilizando una pipeta multicanal o repetidora sobre la cara interna de la tapa de una placa de cultivo de 100 mm de diámetro. En la base de la placa se ponen aproximadamente 10 ml de DPBS, que servirán para mantener unas condiciones de humedad óptimas, evitando que las gotas se sequen. Se voltea la tapa que contiene las gotas sobre la base de la placa con cuidado para que estas no caigan ni se mezclen entre sí. Las placas que contienen las gotas colgantes se incuban a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante dos días.

El medio de diferenciación está compuesto de DMEM con L-glutamina, piruvato y 4,5 g/l glucosa, 20% FCS (suero de uso regular), 1% glutamina, 1% aminoácidos no esenciales, 0,1% 2-mercaptoetanol (todo de Invitrogen).

40

##### 2.1.2.- Recolección de cuerpos embrionarios. (Día 2)

Después de dos días de incubación de las gotas colgantes, las células se han agregado y han formando pequeños cuerpos embrionarios. Las gotas que contienen los cuerpos embrionarios se recogen una a una con una pipeta P1000 para evitar dañar las estructuras. Se depositan en una placa Petri de bacterias a la cual le hemos añadido previamente 10-12 ml de medio de diferenciación. El número de gotas a depositar sobre cada placa es variable y depende del número de cuerpos embrionarios formados (aproximadamente 50). Estos cuerpos embrionarios en suspensión se mantienen en cultivo a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante tres días.

50

##### 2.1.3.- Siembra de cuerpos embrionarios en superficie adherente. (Día 5)

Pasados tres días, los cuerpos embrionarios en suspensión han proliferado y han adquirido un tamaño fácilmente visible. Cada uno de estos cuerpos embrionarios. Para eliminar el suero del medio de diferenciación, los cuerpos embrionarios se pasan por una placa Petri conteniendo medio de diferenciación sin suero. Después se recogen individualmente en un volumen de 250-300  $\mu$ l con una pipeta P1000 y se siembran en una placa de 96 pocillos. Se deposita un cuerpo embrionario por pocillo. Una vez sembrados todos y realizado el tratamiento correspondiente con L-DOPA o dopamina, como se describe en el ejemplo 3.1, se incuban a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Transcurridas unas 5 horas el cuerpo embrionario se adhiere a la superficie de la placa y comienzan a expandirse para formar EBs císticos. En los EBs císticos pueden observarse, entre otros tipos celulares, áreas de contracción espontánea (*foci* de latido), que contienen cardiomiocitos. El período de tiempo transcurrido desde que se siembra el cuerpo embrionario en placa de 96 pocillos hasta que se observan *foci* de latido es variable (1-4 días).

65

## ES 2 340 650 B1

### 2.2.- Diferenciación de las HM1

#### 2.2.1.- Disposición de las células en gotas colgantes. (Día 0)

5 Las células se lavan con 2 ml de PBS y se añade 1 ml de tripsina-EDTA, manteniendo después las células durante 5 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación se despegan las células añadiendo 3 ml de medio con 15% FBS y pipeteando varias veces sin crear burbujas. Se recogen las células y se depositan en un tubo de fondo cónico para centrifugarlas durante 5 minutos a 160 g. Después se desecha el sobrenadante y se resuspenden las células en 10 ml de medio con 15% FBS. Dado que en estos 10 ml se encuentran las células madre embrionarias y los fibroblastos  
10 embrionarios amitóticos que formaban la monocapa, es necesario realizar un preplaqueo para eliminar de la mezcla los fibroblastos y utilizar sólo las células de la línea HM1 para formar los EBs simples. Para ello, la suspensión celular debe añadirse a una placa adherente de 100 mm de diámetro que haya sido gelatinizada e incubarse durante 10 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Este tiempo es suficiente para que los fibroblastos embrionarios de la mezcla queden adheridos a la placa, mientras que las células madre embrionarias permanecen flotando en el medio debido a que su afinidad por la gelatina es ligeramente menor. Pasados los 10 minutos se recogen los 10 ml de medio que sólo contienen células  
15 madre embrionarias y se depositan en un tubo de fondo cónico.

Seguidamente se procede a la preparación de las gotas colgantes para lo cual es necesario obtener una suspensión de células madre embrionarias que contenga  $1,6 \times 10^4$  células/ml. Para ello se realiza un recuento de las células y éstas  
20 se diluyen con el volumen de medio de diferenciación que sea necesario para obtener la concentración mencionada. Las gotas se preparan empleando placas no adherentes de 100 mm de diámetro que contienen 20 ml de PBS en su base. Cada placa se destapa y mediante el uso de una pipeta multicanal se depositan gotas de 30  $\mu$ l correspondientes a la suspensión celular (480 células/gota) en la parte interior de la tapa. Después, con extremo cuidado, se vuelve a tapar la placa de tal modo que las gotas permanecen colgando. De forma estándar se preparan 40 gotas por placa y de 10 a  
25 14 placas. Las placas se incuban durante 7 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 2.2.2.- Recolección de los cuerpos embrionarios y diferenciación a cardiomiocitos. (Día 7)

30 Después de una semana se recogen los EBs simples uno a uno con ayuda de una micropipeta ajustada a un volumen de 200  $\mu$ l y se cultivan en placas de 100 mm de diámetro adherentes y gelatinizadas con 10 ml de medio con 15% de suero. Cada 2 días o cuando el medio toma un color amarillento se sustituye el medio existente por medio fresco. Una vez que los EBs simples se adhieren a las placas comienzan a expandirse para formar EBs císticos. En los EBs císticos  
35 aproximadamente a los 7 días pueden observarse, entre otros tipos celulares, áreas de contracción espontánea (*foci* de latido), que contienen cardiomiocitos.

### Ejemplo 3

#### 40 Tratamiento farmacológico con L-DOPA o dopamina

##### 3.1.- Tratamiento de las células E14 con L-DOPA o dopamina

Tanto para la L-DOPA como para la dopamina (Sigma) se preparó una solución madre de 5 mM en H<sub>2</sub>O estéril.  
45 En las células E14, L-DOPA o dopamina se aplican el día 5 (día de siembra en placa de 96 pocillo). Los cuerpos embrionarios en suspensión se recolectan procurando coger el menor volumen de medio posible. Éstos se depositan en una placa Petri de bacterias que contiene 10 ml de medio de diferenciación sin suero al cual se le ha añadido L-DOPA o dopamina a una concentración final de 10  $\mu$ M. A la placa control se le añade un volumen de H<sub>2</sub>O estéril equivalente al volumen añadido en los tratamientos farmacológicos. Estos cuerpos embrionarios se recogen en 270  $\mu$ l  
50 del medio en el cual se encuentran, y se siembran, uno por pocillo, en una placa de 96 pocillos. Cada día se renuevan 200 de los 270  $\mu$ l de medio que contiene cada pocillo con medio de diferenciación sin suero conteniendo el tratamiento farmacológico durante 5 días.

##### 55 3.2.- Tratamiento de las células HM1 con L-DOPA

Los cuerpos embrionarios de las células HM1 se trataron con 10  $\mu$ M L-DOPA cuando comenzaron a aparecer los  
60 *foci* de latido, aproximadamente a los 7 días de siembra en superficie adherente, que corresponde al día 14 del proceso de diferenciación. Los cuerpos embrionarios se cultivaron adicionalmente durante 6 días en presencia o ausencia de 10  $\mu$ M L-DOPA renovando cada día el medio de cultivo.

65

## ES 2 340 650 B1

### Ejemplo 4

#### *Extracción de ARN*

##### 5 4.1.- *Extracción de ARN de los cuerpos embrionarios de las células E14*

Después de 5 días de tratamiento se recogen conjuntamente todos los cuerpos embrionarios que corresponden al mismo tratamiento y se homogenizaron con 1 ml de trizol (Invitrogen). El lisado se mantiene a temperatura ambiente (TA) 5 minutos, y se añaden 0,2 ml de cloroformo. Se agita vigorosamente y se mantiene 2 ó 3 minutos a TA. Se centrifuga a 12000 rpm, durante 15 minutos a 4°C. Se transfiere la fase acuosa (sobrenadante) a otro tubo y se le añade 1  $\mu$ l de glucógeno (20  $\mu$ g/ $\mu$ l). El glucógeno actúa como transportador del ARN para favorecer su precipitación. Después se añade 0,5 ml de alcohol isopropílico. Se incuban las muestras a TA 10 minutos, y se centrifugan a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se elimina el sobrenadante, y el precipitado se lava con 1 ml de 70% etanol. Se centrifuga a 12000 rpm, 5 minutos, a 4°C. Se elimina el etanol, y el precipitado se deja secar a TA durante 5 minutos. El precipitado (ARN), se resuspende en agua estéril. La cuantificación del ARN se realiza con un NanoDrop (Thermo™ Scientific, USA), y se comprueba la calidad del mismo mediante electroforesis en gel de 0.8% agarosa en Tris Borato-EDTA (TBE) corrido a 140 voltios, 10 min.

##### 20 4.2.- *Extracción en las áreas de latido de las células HMI*

Los *foci* de latido son recortados a los 6 días de tratamiento, recogiendo conjuntamente todos los *foci* correspondientes al mismo tratamiento. La extracción de ARN se realiza como se detalla en el apartado 4.1.

25

### Ejemplo 5

#### *RT-PCR a tiempo real*

##### 30 5.1.- *RT (del inglés Reverse Transcriptase)*

Antes de realizar la transcripción reversa se trató el ARN con ADNasa para eliminar cualquier posible contaminación con ADN genómico. Típicamente se incubaron 1-5  $\mu$ g de ARN con 1  $\mu$ l de DNasa (Invitrogen) durante 15 minutos a 37°C. La reacción se paró con. Éste ARN se incubó con una mezcla que contiene 1  $\mu$ l de oligonucleótidos sintéticos degenerados p(dN)<sub>6</sub>, 1  $\mu$ l de 10 mM dNTP Mix (todo de Invitrogen), y H<sub>2</sub>O destilada estéril hasta completar un volumen de 13  $\mu$ l. Esta mezcla se calienta a 65°C durante 5 minutos, y posteriormente se incubó en hielo 1 minuto. A la mezcla anterior se añade 4  $\mu$ l de 5X First Strand Buffer, 1  $\mu$ l de 0,1M DTT, 1  $\mu$ l de RNaseOUT y 1  $\mu$ l de Superscript™ III RT. La nueva mezcla se incubó a 50°C durante 1 hora. La reacción de la transcriptasa se para calentando la muestra a 70°C durante 15 minutos.

40

##### 5.2.- *PCR cuantitativa*

La PCR cuantitativa (PCRq) se realiza con el ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania) usando la TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems) y sondas de *the Universal Probe Library* (UPL) (Roche Applied Science) para la detección. Esta reacción se lleva a cabo en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid, en la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid. La secuencia de los cebadores de ratón y sus sondas UPL respectivas se describen a continuación:

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

GEN	CEBADOR	SECUENCIA CEBADOR	SONDA	TAMAÑO AMPLICÓN
5 <i>aMHC</i>	qmaMHCF1	SEQ ID NO: 1	84	85
	qmaMHCR1	SEQ ID NO: 2		
10 <i><math>\alpha</math>-actina</i>	qmAlfaActinaF1	SEQ ID NO: 3	9.1	68
	qmAlfaActinaR1	SEQ ID NO: 4		
15 <i><math>\beta</math>-MHC</i>	qmbMHCF1	SEQ ID NO: 5	63	83
	qmbMHCR1	SEQ ID NO: 6		
20 <i>GATA 4</i>	qmGATA4F1	SEQ ID NO: 7	13	63
	qmGATA4R1	SEQ ID NO: 8		
25 <i>MEF2c</i>	qmMEF2F1	SEQ ID NO: 9	10	60
	qmMEF2R1	SEQ ID NO: 10		
30 <i>MLC2A</i>	qmMLC2AF2	SEQ ID NO: 11	4	76
	qmMLC2AR1	SEQ ID NO: 12		
35 <i>MLC2V</i>	qmMLC2VF1	SEQ ID NO: 13	85	70
	qmMLC2VR1	SEQ ID NO: 14		
40 <i>Nkx2.5</i>	qmNKX2.5F2	SEQ ID NO: 15	16	83
	qmNKX2.5R2	SEQ ID NO: 16		
45 <i>TBX2</i>	qmTBX2F1	SEQ ID NO: 17	17	70
	qmTBX2R1	SEQ ID NO: 18		
50 <i>TBX5</i>	qmTBX5F1	SEQ ID NO: 19	9	70
	qmTBX5R1	SEQ ID NO: 20		
55 <i>Troponina T2</i>	qmTT2F1	SEQ ID NO: 21	69	60
	qmTT2R1	SEQ ID NO: 22		

Típicamente, las retrotranscriptasas (RTs) se diluyen 1:10, y para la PCRq se utilizan 5  $\mu$ l de RT de esta dilución, 5,4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 10  $\mu$ l Master Mix, 0,2  $\mu$ l de sonda y 0,2  $\mu$ l de cada uno de los cebadores. Las condiciones de amplificación son: 95°C-10 minutos para desnaturalizar el ADN, y 40 ciclos de amplificación de 95°C-15 minutos y 60°C-1 minuto.

Como gen normalizador se utilizó el 18S ARN ribosómico. Tanto para los genes experimentales como para el normalizador se utilizó como curva estándar RT de ARN de corazón embrionario de ratón E14. Esta RT se preparó a partir de 5  $\mu$ g de ARN.

55

#### Ejemplo 6

##### *Aumento de la expresión de marcadores cardíacos por L-DOPA y dopamina en células E14*

60

La línea de células madre embrionarias de ratón E14 se diferenció mediante el cultivo en gotas colgantes durante dos días. Posteriormente, los EBs formados se crecieron en suspensión durante tres días. Seguidamente los EBs se sembraron individualmente sobre placas de 96 pocillos. En este momento se comenzó el tratamiento de los EBs con 10  $\mu$ M de L-DOPA o 10  $\mu$ M dopamina. Aproximadamente un 75% del medio de cultivo era renovado diariamente para evitar la degradación de las drogas utilizadas. Después de 5 días, todos los cuerpos embrionarios correspondientes al mismo tratamiento se recogieron para la extracción de ARN y posterior realización de RT-PCR cuantitativa.

65

## ES 2 340 650 B1

Como se muestra en la gráfica de la Fig 1, los EBs tratados con L-DOPA y dopamina presentan un aumento de la expresión de factores de transcripción específicos del linaje cardíaco Nkx2.5, GATA4 y TBX5 de entre dos y tres veces con respecto al control. Un aumento más modesto se observó en la expresión de TBX2. Paralelamente, los tratamientos con L-DOPA y dopamina dieron lugar a un aumento en la expresión de las proteínas contráctiles  $\alpha$  MHC y TT2.

Dado que se produce un aumento en la expresión de los factores de transcripción que disparan y estabilizan el programa genético cardíaco con los la L-DOPA y dopamina éstas estarían repercutiendo en el inicio de la diferenciación de las células madre a cardiomiocitos. Así mismo la estimulación en la expresión de proteínas contráctiles indica que también favorece la maduración de los cardiomiocitos.

Además en estos experimentos, los EBs se diferenciaron en medio sin suero (ver materiales y métodos), por lo que el efecto observado en el aumento de la expresión de factores de transcripción específicos de cardiomiocitos así como de proteínas contráctiles es debido a la acción de la L-DOPA o la dopamina.

### Ejemplo 7

#### *Efecto de L-DOPA en maduración de cardiomiocitos*

Las células HM1 se diferenciaron en gotas colgantes durante 7 días. Una vez formados los EBs, los mismos se plaquearon en condiciones adherentes. Una vez que eran detectadas áreas de latido en los EBs, una semana después del plaqueo, se comenzó el tratamiento con 10  $\mu$ M L-DOPA durante 6 días. El medio de cultivo se renovaba diariamente. A los 6 días de tratamiento, todas las áreas de latido correspondientes al mismo tratamiento (L-DOPA, o control), se recogían conjuntamente. La extracción de ARN y posterior RT-PCR a tiempo real se realizó igual que en las células E14.

Como puede observarse en la Fig 2, la L-DOPA induce de forma dramática los niveles de expresión de proteínas contráctiles, aumentando entre 10 y 100 veces (1 y 2 órdenes de magnitud) los niveles de  $\beta$ -MHC (miosina de cadena pesada), MLC2A y MLC2V (ambas miosinas de cadena ligera). En el caso de  $\alpha$ -actina, Troponina T2 y  $\alpha$  MHC (miosina de cadena pesada) el aumento de los niveles se sitúa entre 100 y 1000 veces (2 y 3 órdenes de magnitud) por encima del control. También se observó un aumento pero de menor magnitud (de dos veces) en la expresión del factor de transcripción TBX5.

En este caso, la L-DOPA parece tener un papel importante en la maduración de los cardiomiocitos.

Por otro lado, tanto la L-DOPA como la dopamina inhiben la expresión de marcadores específicos de otros linajes celulares diferentes al linaje cardíaco (datos no mostrados).

Diferentes factores de crecimiento tales como TGF $\beta$  y BMP-2 (Behfar *et al.*, 2002. *Faseb J.*, 16: 1558-1566), Wnt/ $\beta$ -catenina (Naito *et al.*, 2006. *PNAS USA*. 103: 19812-19817), oxitocina (Hatami *et al.*, 2007. *Int. J. Cardiol.*, 117: 80-89) y varios compuestos químicos como ácido retinóico (Wobus *et al.*, 1997. *Differentiation*. 48: 173-182), ácido ascórbico (Takahashi *et al.*, 2003. *Circulation*. 107: 1912-1916) han mostrado efecto inductor de la diferenciación de células stem a cardiomiocitos.

De esta forma tanto la L-DOPA como la dopamina se sumarían a la lista de factores de crecimiento y compuestos químicos capaces de potenciar la diferenciación de células madre embrionarias a cardiomiocitos.

### Ejemplo 8

#### *Patrón de expresión de la tirosina hidroxilasa (TH) en células cardíacas del embrión de pollo*

##### *8.1. Determinación del patrón de expresión por RT-PCR cuantitativa (Fig 3)*

En el embrión de pollo en gastrulación (estadio 5) las células que van a formar el tubo cardíaco se sitúan lateralmente a la línea primitiva, en una región conocida como Hfr (del inglés *Heart forming region*). La TH es detectada por RT-PCR cuantitativa en la Hfr. La expresión de la misma se mantiene en los tubos endocárdicos (TE) del embrión de estadio 8 (st 8), y se alcanza un pico de expresión en asa cardíaca (AC) del embrión de st 10. La RT-PCR cuantitativa se lleva a cabo según lo descrito en el ejemplo 5 pero utilizando cebadores específicos para el gen de la TH de pollo. Como gen normalizador se utilizó la GAPDH de pollo.

GEN	CEBADOR	SECUENCIA CEBADOR	SONDA	TAMAÑO AMPLICÓN
<i>TH</i>	qcTHF1	SEQ ID NO: 23	80	62
	qcTHR1	SEQ ID NO: 24		
<i>GAPDH</i>	qcGAPDHF1	SEQ ID NO: 25	49	65
	qcGAPDHR1	SEQ ID NO: 26		

### 8.2. Determinación del patrón de expresión por hibridación *in situ* (Fig 4)

La *TH* es detectada mediante hibridación *in situ* desde st.8. Dicha expresión aparece restringida a los tubos cardíacos en este estadio, manteniéndose la misma en el corazón hasta st.35 (estadio más avanzado que ha sido estudiado). La expresión proteica de la enzima detectada por inmunohistoquímica en los tubos endocárdicos desde st.9.

### 8.3. Determinación de la actividad funcional de la *TH* endógena de pollo

En el embrión de pollo de st10 se ha detectado L-DOPA mediante HPLC, mostrándose así que la enzima endógena es funcional.

#### Ejemplo 9

#### Inducción de marcadores cardíacos por L-DOPA y dopamina (Fig 5)

Las microesferas acrílicas de heparina (Sigma), son usadas habitualmente en biología del desarrollo por su capacidad de adherir a su superficie diferentes sustancias tales como ácido retinóico, factores de crecimiento (FGFs, etc). El tipo de unión o adhesión de dichas moléculas, así como la forma de liberación de las mismas se desconoce.

Las microesferas se seleccionaron en función del tamaño, utilizándose en nuestro estudio aquellas que poseían 150  $\mu$ m de diámetro. Estas microesferas se incubaron durante al menos 4 horas en una gota que contiene la sustancia objeto de estudio a la concentración deseada. Como control de la DOPA y de la dopamina, se usaron microesferas incubadas en PBS. Como control de la 3-I-Tyr se usaron microesferas incubadas en HCl, al ser este utilizado para la correcta disolución de la droga.

Transcurrido el tiempo de incubación, las microesferas se implantaron en los embriones de estadios y posiciones descritas. Para ello, se colocaron los embriones en cultivo EC (Chapman *et al.*, 2001. *Dev Dyn.* 220: 284-289), con la parte ventral hacia arriba. Se realizó una pequeña incisión en el endodermo del embrión en la posición deseada, utilizando para ello espinas de cactus. Las microesferas se depositaron sobre dicha incisión ayudados por unas pinzas. Utilizando de nuevo una espina de cactus, las microesferas se implantaron en la cavidad existente entre el endodermo y el ectodermo embrionario.

Al implantar microesferas acrílicas de heparina recubiertas de L-DOPA o dopamina laterales al Hfr st 5 y tras 12 horas de incubación, hemos detectado la inducción ectópica, en torno a dichas microesferas, de proteínas contráctiles cardíacas como AMHC (miosina auricular de cadena pesada), VMHC (miosina ventricular de cadena pesada), y de factores de transcripción implicados en desarrollo cardíaco como Tbx5.

Esta inducción es dependiente de la región donde se implante la microesfera. Así, microesferas se colocan en st 5, dentro del Hfr, o en st 4 en posición lateral al nódulo de Hensen o dentro de las crestas germinales, no se produce inducción de marcadores cardíacos. Tampoco fue detectada la inducción de otros marcadores específicos de mesodermo.

#### Ejemplo 10

#### Inhibición de marcadores cardíacos por 3-yodo-tirosina y tetahidroxibenzilhidrazina. (Fig 6)

La 3-yodo-tirosina (3-I-Tyr) es un inhibidor de la síntesis de L-DOPA. Microesferas impregnadas con 3-I-Tyr e implantadas laterales al Hfr tras una incubación de 4-6 horas inhiben la expresión endógena de las proteínas contráctiles AMHC y VMHC. Así mismo, microesferas impregnadas con metahidroxibenzilhidrazina (mHBH) que es un inhibidor de la biosíntesis de dopamina, disminuye la expresión endógena de proteínas AMHC y VMHC. Estos

## ES 2 340 650 B1

marcadores cardíacos se detectaron mediante la técnica de hibridación *in situ*. Dicha técnica consiste en la detección del ARN mensajero (ARNm) de interés, mediante la utilización de una sonda de ARN marcada y complementaria al ARNm objeto de estudio. La sonda se genera mediante la transcripción *in vitro* a partir de su ADN complementario (ADNc) introducido en un vector de expresión.

5 Para generar cada sonda típicamente se linealizaron 10  $\mu\text{g}$  del plásmido que contiene el ADNc con una enzima de restricción que corta 5' aguas arriba del ADNc. Esta digestión se realizó utilizando 100 unidades de enzima de restricción durante 2 horas a la temperatura a la cual es activa dicha enzima. Transcurrido este tiempo, se comprobó que todo el vector presente en la muestra está linealizado. Para ello se realizó una electroforesis de 200-300 ng de la  
10 digestión en un gel de agarosa al 1% en Tris-Borato-EDTA (TBE). El plásmido completamente linealizado se extrajo con un volumen de fenol/cloroformo/isoamil alcohol (25:24:1) y se centrifugó durante 2 minutos a 4°C a 12000 rpm. Se realizó una segunda extracción con un volumen de cloroformo/isoamil alcohol (24:1). Se recogió el sobrenadante y se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 durante al menos  
15 de 70% etanol. Se centrifugó durante 20 minutos a 12000 rpm y 4°C. El precipitado obtenido se lavó con un volumen de 70% etanol. Tras el lavado, el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas.

Para la síntesis de la sonda se incubó 1  $\mu\text{g}$  de plásmido linealizado con 2  $\mu\text{l}$  de 10X *buffer* de transcripción, 2  $\mu\text{l}$  de 0,1 M ditioneitol (DTT), 2  $\mu\text{l}$  de 10X nucleótidos marcados con digoxigenina, 0,5  $\mu\text{l}$  de inhibidor de RNasas, 1  $\mu\text{l}$  de  
20 ARN polimerasa (SP6, T7 ó T3) (todo de Roche) y hasta completar un volumen de 20  $\mu\text{l}$  con agua libre de RNasas, a 37°C durante 2 horas. La sonda sintetizada se precipitó con 16,4  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas, 1,6  $\mu\text{l}$  de 0,5 M etilendiaminotetraacético (EDTA), 2  $\mu\text{l}$  de 8 M cloruro de litio y 120  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto durante 2 horas a -20°C. Se centrifugó transcurrido este tiempo a 12000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El precipitado obtenido se lavó con 70% etanol. El precipitado se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de 10 mM EDTA. Para comprobar la calidad de las sondas generadas,  
25 éstas se fraccionaron en geles de agarosa 0,8% (p/v) en TBE.

Los embriones completos de pollo se fijaron en 4% PFA en PBS, previamente tratado con DEPC y esterilizado, durante al menos 16 horas a 4°C. Se lavaron con PBT (PBS-DEPC, 0,1% Tritón X-100) y a continuación se deshidrataron mediante soluciones seriadas de metanol en PBT a concentraciones crecientes (25%, 50%, 75%) durante  
30 10 minutos cada una, y se lavaron dos veces con metanol 100%. La rehidratación de las muestras se realizó con las mismas soluciones de metanol en sentido inverso y se lavaron dos veces con PBT, 5 minutos cada vez.

Para eliminar la actividad peroxidasa endógena de las muestras, éstas se trataron con 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 5-30 minutos (depende del estadio embrionario; por ejemplo, 15 minutos para st 10) a temperatura ambiente y en oscuridad.  
35 Posteriormente se lavaron con PBT durante 5 minutos.

Para mejorar su permeabilización se trataron con 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteinasa K (Promega) durante un tiempo variable dependiendo del estadio (4 minutos para st 4-7; 7 minutos st 7-10; 9 minutos st 11-13) a temperatura ambiente y se lavaron con PBT durante 5 minutos. Posteriormente se refijaron los embriones con 4% PFA en PBT durante 20  
40 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con PBT durante 5 minutos.

Los embriones se preincubaron con tampón de hibridación durante 5 minutos a 57-60°C. Dicho tampón está compuesto de una mezcla de 50% de formamida (v/v), 5XSSC, 2% (p/v) de *Boehringer Blocking Powder* (Roche), 0,1% (v/v) de Tritón X-100, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de heparina (Sigma), 1 mg/ml de ARN de transferencia (Sigma), 5 mM EDTA, 0,1% (p/v) de CHAPS (Calbiochem, Alemania) en agua DEPC. Las ribosondas se desnaturalizaron en esta misma solución a 70°C durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo de preincubación, se incubaron los embriones en el tampón de hibridación en presencia de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de la ribosonda durante al menos 16 horas a 57-60°C. Se lavaron a la misma temperatura de hibridación, con 2XSSC, 0,1% (p/v) CHAPS (5 veces) 5 minutos las dos primeras y 20 minutos las 3 restantes. Posteriormente con 0,2XSSC, 0,1% CHAPS, 3 veces durante 20 minutos cada vez. Se realizaron tres lavados  
50 con 0,1% KTBT (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, KCl 10 mM, 0,1% Tritón X-100) durante 5 minutos cada uno a temperatura ambiente.

Para la detección de los nucleótidos marcados con digoxigenina primero se bloquearon los embriones con 15% de suero fetal bovino (Invitrogen) (v/v), 0,7% de *Boehringer Blocking Powder* en 0,1% KTBT durante 2-3 horas a 4°C. Posteriormente los embriones se incubaron con una dilución de anticuerpo primario anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina 1/1000 (Roche) en solución de bloqueo fresca durante al menos 16 horas a 4°C. Tras la incubación se lavaron los embriones (durante al menos 3 horas cambiando la solución cada 30 minutos) con 0,3% KTBT (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM KCl, 0,3% Tritón X-100) y posteriormente se dejaron lavando durante 16 horas más con esta solución a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno con NTMT (100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0,1% Tween, 1 mM levamisol (Sigma)). Se incubaron los embriones en oscuridad con 3  $\mu\text{l}$  de azul de nitrotetrazolio (NBT) y 2,3  $\mu\text{l}$  de 5-bromo-4-cloro-3-indosil-fosfato (BCIP) (Roche) en 1 ml de NTMT. Cuando el desarrollo del color azul típico del NBT/BCIP fue óptimo la reacción se paró lavando los embriones con 0,3% KTBT y se visualizaron los embriones en un microscopio Axioskop de Zeiss (Oberkochen, Alemania) bajo la luz visible.  
65

Todos los pasos de la hibridación *in situ*, salvo el de la proteinasa K, se realizaron en agitación.

## ES 2 340 650 B1

### Ejemplo 11

*Efecto de la tirosina hidroxilasa (TH) por electroporación. (Fig 7)*

5 Además de los experimentos farmacológicos descritos anteriormente hemos realizado experimentos genéticos de ganancia de función. Embriones de pollo en st 3 y st 3+ fueron electroporados en la línea primitiva, región por la que están migrando las células que darán lugar al corazón, con el ADNc de la *TH* de pollo. En los embriones electroporados se observó mediante hibridación *in situ* un notable aumento en la expresión de las miosinas auriculares y ventriculares (AMHC y VMHC) en los tubos cardiacos y en el corazón.

10 Sin embargo, no se indujo dicha expresión en las células electroporadas cuyo destino final no fue el corazón.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 340 650 B1

## REIVINDICACIONES

1. Uso de catecolamina para la diferenciación de células madre a cardiomiocitos.

5 2. Uso según la reivindicación 1 donde la catecolamina se selecciona del grupo que consiste en: L-DOPA, dopamina, cualquiera de sus sales, análogos o cualquier combinación de las anteriores.

10 3. Uso de catecolamina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde las células madre son células madre embrionarias no humanas.

4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde las células madre embrionarias pertenecen a ratón.

5. Uso según la reivindicación 3 donde las células madre embrionarias pertenecen a la línea celular E14 de ratón.

15 6. Uso según la reivindicación 3 donde las células madre embrionarias pertenecen a la línea celular HM1 de ratón.

7. Uso de catecolamina para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un daño cardíaco mediante la diferenciación de células : madre a cardiomiocitos.

20 8. Método para la diferenciación de células madre a cardiomiocitos que comprende:

a. cultivar una línea de células madre en un medio de cultivo de diferenciación,

25 b. adicionar catecolamina al medio de diferenciación en el que se encuentran las células cultivadas según (a),

c. renovar periódicamente el medio de cultivo de diferenciación con catecolamina del paso (b),

d. recolectar los cardiomiocitos generados en (c).

30 9. Método según la reivindicación 8 donde las células madre son células madre embrionarias no humanas y comprende:

35 a. cultivar una línea celular en un medio de cultivo de diferenciación para obtener cuerpos embrionarios,

b. recolectar los cuerpos embrionarios obtenidos en (a),

40 c. adicionar catecolamina al medio de diferenciación donde se encuentran los cuerpos embrionarios obtenidos en (b),

d. renovar periódicamente el medio de cultivo de diferenciación con catecolamina del paso (c),

e. recolectar los cardiomiocitos generados en (d).

45 10. Método según la reivindicación 9 donde las células madre embrionarias pertenecen a la línea celular E14 de ratón.

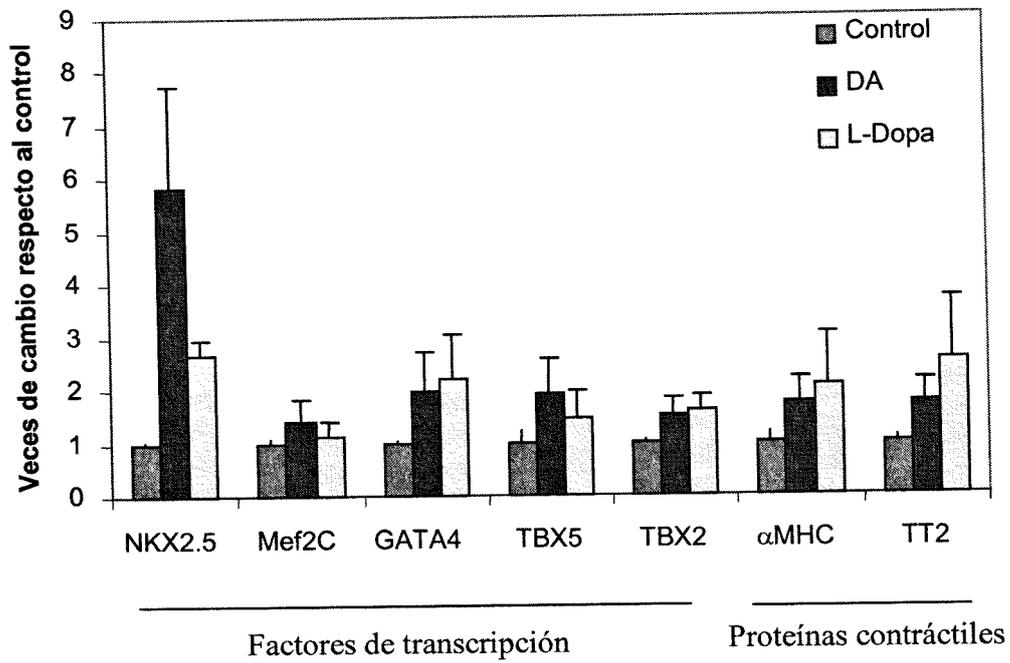
50 11. Método según la reivindicación 9 donde las células madre embrionarias pertenecen a la línea celular HM1 de ratón.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 donde la catecolamina se selecciona del grupo que consiste en: L-DOPA, dopamina, cualquiera de sus sales, análogos o cualquier combinación de las anteriores.

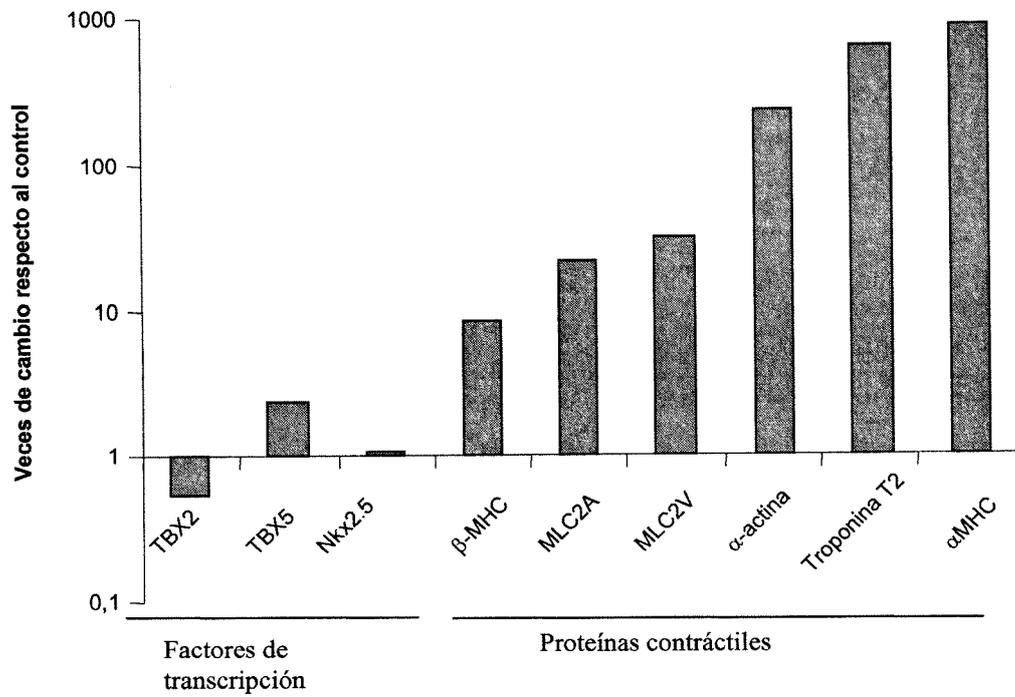
55 13. Método según la reivindicación 12 donde la concentración de L-DOPA y/o dopamina es de entre 1 y 50  $\mu\text{M}$ .

60

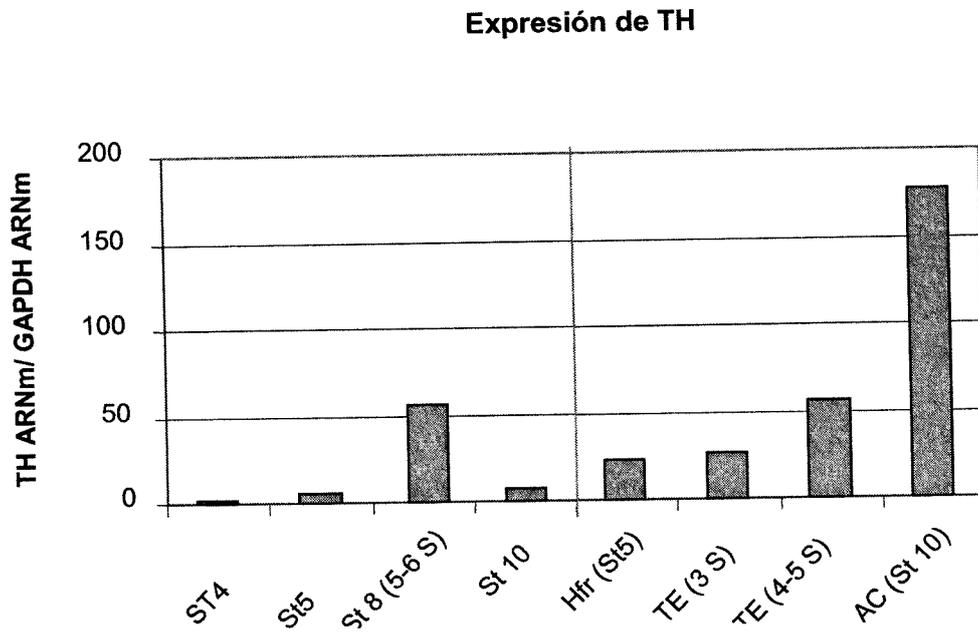
65



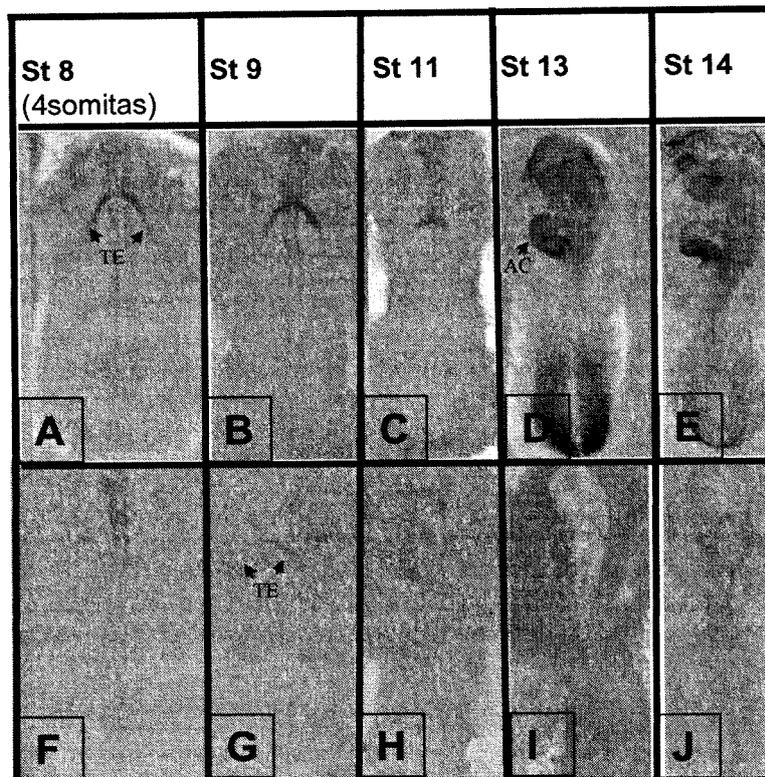
**FIG. 1**



**FIG. 2**



**FIG. 3**



**FIG. 4**

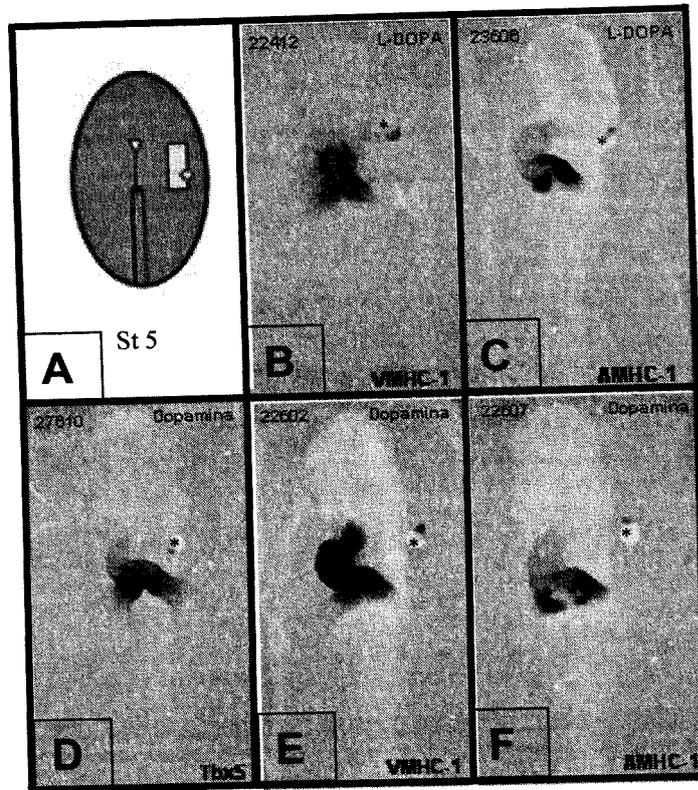


FIG. 5

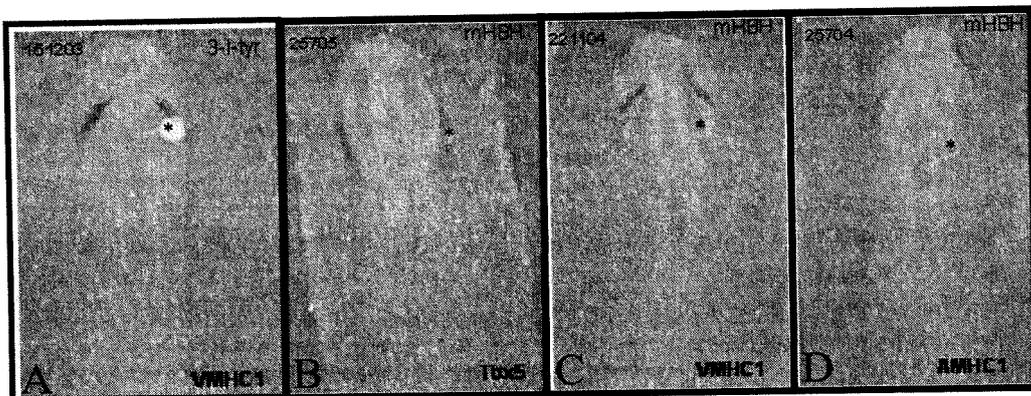
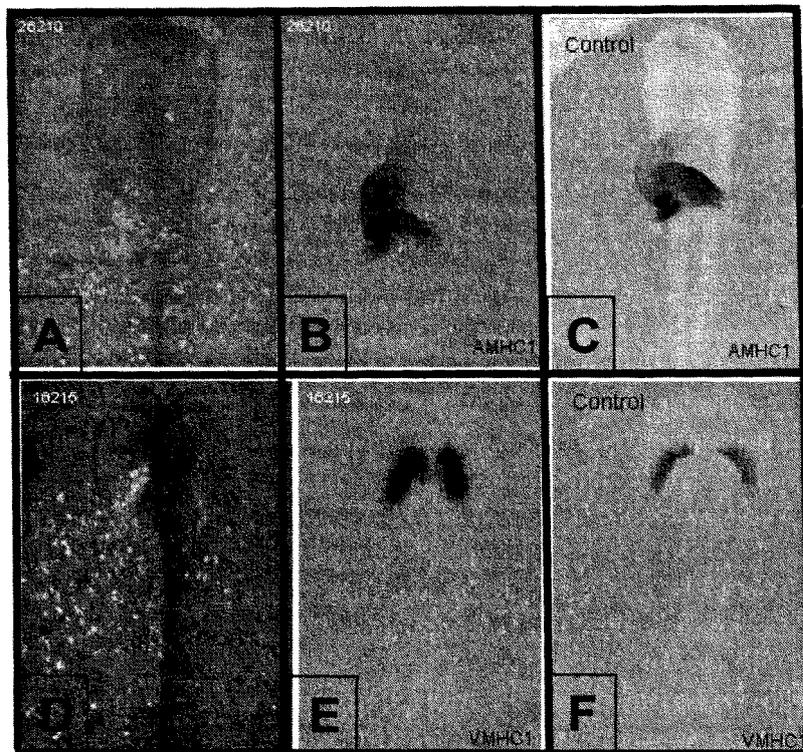


FIG. 6



**FIG. 7**

# ES 2 340 650 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA UNIVERSIDAD DE JAÉN	
10	<120> USO DE CATECOLAMINA PARA LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE A CARDIOMIOCITOS	
	<130> 1641.61	
15	<160> 26	
	<170> PatentIn versión 3.5	
20	<210> 1 <211> 19 <212> DNA <213> <i>Mus musculus</i>	
25	<400> 1  cggaaactga aagcгааag	19
30	<210> 2 <211> 21 <212> DNA <213> <i>Mus musculus</i>	
35	<400> 2  tcctcgatct tgtcгааactt g	21
40	<210> 3 <211> 23 <212> DNA <213> <i>Mus musculus</i>	
45	<400> 3  gaagagctat gaacttcctg acg	23
50	<210> 4 <211> 18 <212> DNA <213> <i>Mus musculus</i>	
55	<400> 4  tctctggaca gcгааagc	18
60	<210> 5 <211> 20 <212> DNA	
65		

## ES 2 340 650 B1

	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 5	
5	tgcatgacc tcacgagaa	20
	<210> 6	
10	<211> 19	
	<212> DNA	
	<21B> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 6	
15	gtcatgtctg tggccttgg	19
	<210> 7	
20	<211> 21	
	<212> DNA	
	<21B> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 7	
25	ccccaatctc gatagtgttg a	21
	<210> 8	
30	<211> 18	
	<212> DNA	
	<21B> <i>Mus musculus</i>	
35	<400> 8	
	atggccccac aattgaca	18
40	<210> 9	
	<211> 24	
	<212> DNA	
45	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 9	
50	tcaagagtca taaaattcct gctg	24
	<210> 10	
	<211> 21	
55	<212> DNA	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 10	
60	ggatggtaac tggcatctca a	21
	<210> 11	
65	<211> 20	
	<212> DNA	

## ES 2 340 650 B1

	<i>&lt;213&gt; Mus musculus</i>	
	<i>&lt;400&gt; 11</i>	
5	aagtgttccg gaggaagagc	20
	<i>&lt;210&gt; 12</i>	
10	<i>&lt;211&gt; 21</i>	
	<i>&lt;212&gt; DNA</i>	
	<i>&lt;213&gt; Mus musculus</i>	
15	<i>&lt;400&gt; 12</i>	
	tgtgaggaag acggtgaagt t	21
20	<i>&lt;210&gt; 13</i>	
	<i>&lt;211&gt; 24</i>	
	<i>&lt;212&gt; DNA</i>	
	<i>&lt;213&gt; Mus musculus</i>	
25	<i>&lt;400&gt; 13</i>	
	gaagagatcg atgaaatgat caaa	24
30	<i>&lt;210&gt; 14</i>	
	<i>&lt;211&gt; 20</i>	
	<i>&lt;212&gt; DNA</i>	
35	<i>&lt;213&gt; Mus musculus</i>	
	<i>&lt;400&gt; 14</i>	
40	caaacatcgt gaggaacacg	20
	<i>&lt;210&gt; 15</i>	
	<i>&lt;211&gt; 18</i>	
45	<i>&lt;212&gt; DNA</i>	
	<i>&lt;213&gt; Mus musculus</i>	
	<i>&lt;400&gt; 15</i>	
50	gtctggggac ctgtctgc	18
	<i>&lt;210&gt; 16</i>	
55	<i>&lt;211&gt; 18</i>	
	<i>&lt;212&gt; DNA</i>	
	<i>&lt;213&gt; Mus musculus</i>	
60	<i>&lt;400&gt; 16</i>	
	agtaggcctc gggcttga	18
65	<i>&lt;210&gt; 17</i>	
	<i>&lt;211&gt; 18</i>	
	<i>&lt;212&gt; DNA</i>	

## ES 2 340 650 B1

	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 17	
5	gacgacgtgg aggacgac	18
	<210> 18	
10	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
15	<400> 18	
	ccagcttggtg gaactggtc	19
20	<210> 19	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
25	<400> 19	
	cgaagtgggc acagagatg	19
30	<210> 20	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
35	<400> 20	
	caccttcact ttgtaactag gaaaca	26
40	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> DNA	
45	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 21	
50	aggctcactt cgagaacagg	20
	<210> 22	
	<211> 21	
55	<212> DNA	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
60	<400> 22	
	tctgtcttt gagggaaatc a	21
65	<210> 23	
	<211> 18	
	<212> DNA	





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 340 650

② N° de solicitud: 200802422

③ Fecha de presentación de la solicitud: **13.08.2008**

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12N 5/075** (2010.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DIMARAKIS, I., et al. (a) In vitro stem cell differentiation into cardiomyocytes. Part 1. Culture medium and growth factors. Journal of Cardiothoracic-Renal Research. Sept 2006. Vol. 1, nº 2, páginas 107-114. ISSN 1574-0668. Ver todo el documento.	1-13
A	DIMARAKIS, I., et al. (b) In vitro stem cell differentiation into cardiomyocytes. Part 2: Chemicals, extracellular matrix, physical stimuli and coculture assays. Journal of Cardiothoracic-Renal Research. Sept 2006. Vol. 1, nº 2, páginas 115-121. ISSN 1574-0668. Ver todo el documento.	1-13
A	WEI, H., et al. Embryonic stem cells and cardiomyocyte differentiation: phenotypic and molecular analyses. Journal of cellular and molecular medicine. Oct-Dic 2005. Vol. 9, nº 4, páginas 804-817. ISSN 1582-1838. Ver todo el documento.	1-13
A	SACHINIDIS, A., et al. Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. Cardiovascular Research. 01.05.2003. Vol. 58, nº 2, páginas 278-291. ISSN 0008-6363. Ver todo el documento.	1-13
A	MAURITZ, C., et al. Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. Circulation. 19.07.2008. Vol. 118, nº 5, páginas 507-517. ISSN 0009-7322. Ver todo el documento, especialmente Resumen, figura 3 y páginas 514 a 516.	1-13
A	CHEN, Y., et al. Cyclic adenosine 3',5'- monophosphate induces differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes. Cell Biology International. Abril 2006. Vol. 30, nº 4, páginas 301-307. ISSN 1065-6995. Ver todo el documento.	1-13

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

21.05.2010

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

1/6



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 340 650

② Nº de solicitud: 200802422

③ Fecha de presentación de la solicitud: 13.08.2008

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12N 5/075 (2010.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	YANG, H., et al. Mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes express functional adrenoceptors. Biochemical and biophysical research communications. 18-04-2008. Vol. 368, nº 4, páginas 887-892. ISSN 1090-2104 (Electrónico). Ver todo el documento.	1-13

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

21.05.2010

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

2/6

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.05.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-13	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-13	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	DIMARAKIS, I., et al. (a)	Sept-06
D02	DIMARAKIS, I., et al. (b)	Sept-06
D03	WEI, H., et al.	Oct-05
D04	SACHINIDIS, A., et al.	01-05-03
D05	MAURITZ, C., et al.	19-07-08
D06	CHEN, Y., et al.	Abr-06
D07	YANG, H., et al.	18-04-08

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud de patente se refiere al uso de catecolamina en la diferenciación de células madre a cardiomiocitos, y, más concretamente, en la diferenciación de células madre embrionarias de líneas celulares de ratón.

Se han encontrado en el estado de la técnica multitud de documentos relacionados con el proceso de diferenciación de células madre a cardiomiocitos en diferentes organismos, y en todos ellos se describen múltiples compuestos que, añadidos al medio de cultivo, favorecen la diferenciación. Sin embargo, en ningún caso, se incluyen las catecolaminas entre los compuestos inductores de la mencionada diferenciación, por lo que la invención se considera nueva y con actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes.

De todos estos documentos del estado de la técnica, se han seleccionado, para incluir en el presente informe, algunas revisiones que resumen el estado actual de la diferenciación de células madre a cardiomiocitos.

En los documentos D01 y D02 se describen con detalle varios compuestos y condiciones de cultivo que afectan el proceso de diferenciación de células madre a cardiomiocitos en mamíferos. Entre los primeros, el estudio destaca el uso en los medios de cultivo de citoquinas y factores de crecimiento, como las proteínas BMP, TGF-beta, activinas, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), insulinas, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor inhibidor de leucemia (LIF) y cardiotropina 1, eritropoyetina, ácido ascórbico y dimetilsulfóxido (DMSO). En cuanto a las condiciones de cultivo, hace hincapié en el efecto de las matrices extracelulares, co-cultivo con distintos tipos celulares endoteliales y estímulos físicos (eléctricos o térmicos).

En el documento D03 se revisan igualmente las distintas condiciones de cultivo que influyen en la diferenciación de células madre a cardiomiocitos, analizando separadamente la diferenciación de líneas celulares murinas y humanas, y realizando estudios de expresión de marcadores cardiacos en los cardiomiocitos diferenciados, igual que se hace en la solicitud. Para generar las condiciones óptimas de diferenciación se utiliza medio de reemplazamiento sin suero con diferentes suplementos que favorecen la diferenciación, como insulina y transferrina, PDGF o esfingosina-1-fosfato (SPP), LIF, ácido retinoico y DMSO, o la proteína del retinoblastoma (Rb), entre otros.

El documento D04 es otra revisión de las condiciones específicas de diferenciación de células madre embrionarias de ratón a células cardiacas, y en él se resumen tanto los factores que favorecen esta diferenciación como los marcadores cardiacos específicos que expresan los cardiomiocitos generados.

En ninguna de estas revisiones se menciona la utilización de catecolaminas como factores activadores de la diferenciación de células madre embrionarias a cardiomiocitos, por lo que no se considera que ninguno de estos documentos afecte la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud.

El documento D05 es un ejemplo de los muchos encontrados en los que se generan cardiomiocitos funcionales a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSs) de ratón y se comparan con los obtenidos a partir de células madre embrionarias. El procedimiento es semejante al de la solicitud, y, como en ésta, se aprecia un aumento en la expresión de los marcadores cardiacos, pero no se emplean catecolaminas en el proceso de inducción de la diferenciación, y, por tanto, este documento tampoco afectaría la novedad ni la actividad inventiva de la presente solicitud.

## Hoja adicional

En el artículo D06 se describe un nuevo compuesto inductor de la diferenciación de células madre a cardiomiocitos en ratón. Se trata de AMP cíclico (cAMP). El procedimiento de diferenciación es muy similar al descrito en los ejemplos de la presente solicitud, ya que se basa en la formación de cuerpos embrionarios que se incuban en medio DMEM suplementado con glutamina, beta-mercaptoetanol y antibióticos. A diferencia de la solicitud, en D06 se añaden cAMP como compuesto inductor de la diferenciación, y se establece la concentración óptima del compuesto (ver figura 1). Igual que en la solicitud, la expresión de genes cardiacos, medida por RT-PCR, se usa como índice de diferenciación. Como en los casos anteriores, se considera que este documento no afectaría la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud.

Por último, el documento D07 consiste en un estudio del efecto de las catecolaminas en el desarrollo de cardiomiocitos derivados de células embrionarias de ratón (ESCMs). En este trabajo se añaden al cultivo distintas catecolaminas (derivados de epinefrina, sus agonistas y antagonistas), para estudiar el efecto de estos compuestos en la expresión de los principales subtipos de receptores adrenérgicos durante la diferenciación temprana de los cardiomiocitos. Aunque este documento coincide con la solicitud en que ambos estudian el efecto de las catecolaminas en el desarrollo de los cardiomiocitos, no se considera evidente que el experto en la materia pueda llegar al procedimiento reivindicado en la solicitud a partir de lo divulgado en D07, por lo que la solicitud cumpliría los requisitos de novedad y actividad inventiva.