

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 698**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/077** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2014 PCT/NL2014/050366**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014 WO14200339**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2014 E 14732446 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3008172**

54 Título: **Composiciones de medio de cultivo para la maduración de cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes de mamíferos**

30 Prioridad:

**11.06.2013 NL 2010953**

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

**18.02.2021**

73 Titular/es:

**NCARDIA B.V. (100.0%)  
Galileiweg 8  
2333 BD Leiden, NL**

72 Inventor/es:

**BRAAM, STEFAN ROBBERT**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 806 698 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

Composiciones de medio de cultivo para la maduración de cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes de mamíferos

### Campo de la invención

5 La presente invención generalmente se refiere al campo del cultivo celular y la biología de células madre. Más específicamente, la presente invención se refiere a la maduración de cardiomiocitos tipo fetal (inmaduros) derivados de células madre embrionarias pluripotentes (PESC). Particularmente, la presente invención proporciona composiciones y procedimientos definidos químicamente de generación de cardiomiocitos de tipo adulto a partir de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC de mamíferos *in vitro*. En ciertos aspectos de la invención, se proporcionan procedimientos usando las composiciones químicamente definidas de la invención para generar cardiomiocitos de tipo adulto a partir de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC de mamífero *in vitro*. Las composiciones de medios de cultivo químicamente definidos, los cardiomiocitos de tipo adulto generados y los procedimientos de la invención encuentran aplicaciones en los campos de descubrimiento de fármacos, ensayos de cardiotoxicidad inducida por fármacos, ensayos de cribado de toxicología predictiva, cribado preclínico de fármacos candidatos, investigación cardiovascular y modelado de enfermedades cardíacas, medicina regenerativa y otras aplicaciones destinadas a modelar o tratar afecciones cardíacas en adultos.

### Antecedentes de la invención

20 El progreso en varias áreas de la medicina (esto es, salud mental, cardiología, inmunidad, etc.), donde se necesitan fármacos nuevos y más eficaces, se ve severamente obstaculizado por el coste extremo engendrado por los efectos adversos no deseados inducidos por fármacos asociados con varios compuestos de plomo candidatos en el desarrollo de descubrimiento de fármacos. Una desventaja importante del procedimiento actual de descubrimiento de fármacos, para todo el desarrollo de fármacos, es la alta tasa de desgaste de los compuestos de plomo causados por efectos adversos imprevistos del fármaco, en particular los efectos cardiotoxícos, a menudo detectados en las fases posteriores del desarrollo de descubrimiento de fármacos, más que en las primeras. La prevención de la cardiotoxicidad inducida por fármacos, que se puede manifestar como arritmias cardíacas, representa la máxima prioridad para las agencias reguladoras y las empresas (bio) farmacéuticas, ya que la manifestación de este tipo de toxicidad es potencialmente mortal. Se ha demostrado que el 33% de los eventos adversos de seguridad en los estudios clínicos generalmente se atribuyen a efectos arritmicos cardíacos, que pueden conducir a la muerte súbita o complicaciones cardíacas graves en los sujetos (Mordwinkin et al (2013) Journal of cardiovascular translational research, Vol:6(1):22-30).

35 Por lo tanto, existe una necesidad urgente de nuevas estrategias rentables para mejorar el procedimiento tradicional de desarrollo/descubrimiento de fármacos, por ejemplo, eliminar los efectos cardiotoxícos inducidos por fármacos. En particular, existe una urgente necesidad insatisfecha de predecir la cardiotoxicidad inducida por fármacos en una etapa temprana del procedimiento de desarrollo de fármacos. Durante la última década, se han dedicado considerables esfuerzos de investigación hacia este objetivo. Por ejemplo, se han desarrollado varios modelos y herramientas biológicas que incluyen el uso de células madre pluripotentes, ensayos de canales iónicos y herramientas computacionales. En particular, el uso de cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes es un foco de interés actual en el desarrollo de ensayos predictivos innovadores para rectificar los problemas relacionados con la cardiotoxicidad durante el desarrollo de fármacos.

45 Las células madre pluripotentes, tales como las células madre embrionarias pluripotentes (PESC) y las células madre pluripotentes inducidas (iPSC), son una fuente potencial de células de generación de cardiomiocitos en cultivo *in vitro*. El uso de cardiomiocitos no solo es importante para el desarrollo de ensayos para predecir la toxicidad inducida por fármacos para todos los fármacos en desarrollo, sino que también es importante para la investigación cardíaca, así como para el desarrollo de nuevos fármacos cardíacos en general, donde los cardiomiocitos se pueden usar para descubrir nuevos objetivos farmacológicos y evaluar la seguridad cardíaca de los fármacos. La capacidad de producir cardiomiocitos a partir de PESC y/o iPSC *in vitro* también abre otras vías terapéuticas, tales como la medicina regenerativa, donde los cardiomiocitos derivados de PESC y/o iPSC se pueden usar para reparar directamente los tejidos cardíacos dañados en pacientes que lo necesitan, por ejemplo.

50 La capacidad de usar cardiomiocitos en el desarrollo/descubrimiento de fármacos, ensayo de seguridad de fármacos, modelado de enfermedades cardíacas, investigación cardíaca, medicina regenerativa y otros fines biológicos depende en gran medida de la capacidad de cultivar y obtener cardiomiocitos derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro*, que debe cumplir ciertos requisitos fenotípicos tales como, por ejemplo, un cierto nivel de propiedades funcionales (por ejemplo, patrones electrofisiológicos de tipo adulto) y/o perfil genético (por ejemplo, expresión de tipo adulto de los marcadores genéticos específicos del destino de las células), y/o aspectos morfológicos. (por ejemplo, forma de tipo adulto y propiedades histológicas).

A este respecto, una limitación principal de la técnica es que los procedimientos actuales y las composiciones de medios de cultivo de generación de cardiomiocitos a partir de PESC y/o iPSC en cultivos *in vitro* producen

resultados que son subóptimos y no coinciden o solo en parte con los requisitos para aplicaciones tales como desarrollo/descubrimiento de fármacos, ensayo de seguridad de fármacos, modelado de enfermedades cardíacas, investigación cardíaca, medicina regenerativa, donde se necesitan cardiomiocitos apropiados para el contexto de "vida real" (esto es, estado de tipo adulto). Esto se debe a que los procedimientos actuales y las composiciones de medio de cultivo producen cardiomiocitos inmaduros, que son similares a los cardiomiocitos fetales (de tipo fetal). Tales cardiomiocitos son inadecuados para su uso en aplicaciones tales como desarrollo/descubrimiento de fármacos, ensayo de seguridad de fármacos, modelado de enfermedades cardíacas, investigación cardíaca, medicina regenerativa y otros fines destinados a modelar o tratar afecciones cardíacas que generalmente ocurren en la edad adulta y no en etapas de desarrollo más tempranas. Por consiguiente, los cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto son más apropiados que los cardiomiocitos inmaduros o los cardiomiocitos de tipo fetal para estos fines.

Por lo tanto, existe la necesidad de procedimientos mejorados y de composiciones de medio de cultivo de generación de cardiomiocitos de tipo adulto (en oposición a los cardiomiocitos inmaduros) a partir de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro*. También existe la necesidad de procedimientos mejorados y de composiciones de medio de cultivo para producir una mayor cantidad (mayor rendimiento) de cardiomiocitos de tipo adulto derivados de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal, que a su vez se derivan de PESC y/o iPSC en la diferenciación *in vitro* de las células madre.

Es un objeto de la presente invención superar las principales limitaciones de la técnica proporcionando de composiciones de medio de cultivo químicamente definidas que promueven la maduración de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal, que se derivan de células madre embrionarias pluripotentes en cultivo *in vitro* y procedimientos de generación de dichos cardiomiocitos de tipo adulto en cultivo *in vitro*, que son más eficientes y apoyan la producción a gran escala de cardiomiocitos de tipo adulto que cumplen los requisitos generales para la investigación cardíaca y las aplicaciones clínicas.

## Descripción detallada de la invención

### Definición general

En la siguiente descripción y ejemplos, se usa una serie de términos. Con el fin de proporcionar una comprensión clara y coherente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, incluido el alcance que debe darse a tales términos, se proporcionan las siguientes definiciones. A menos que se defina lo contrario en la presente memoria, todos los términos técnicos y científicos usados tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Las divulgaciones de todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias se incorporan en la presente memoria en su totalidad por referencia.

El término "células madre", como se usa en la presente memoria, se refiere a células indiferenciadas definidas por su capacidad a nivel de una sola célula para autorenovarse y diferenciarse para producir células de progeñe, incluyendo progenitores autorrenovadores, progenitores no renovables y células diferenciadas terminalmente. Las células madre tienen la capacidad de dividirse por períodos indefinidos en cultivo. Las células madre también se caracterizan por su capacidad para diferenciar *in vitro* en células funcionales de diversos linajes celulares de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar lugar a tejidos de múltiples capas germinales después del trasplante y contribuir sustancialmente a la mayoría, si no todos, los tejidos después de la inyección en blastocistos. Las células madre se clasifican como células madre somáticas (adultas) o células madre embrionarias. Una célula madre somática es una célula indiferenciada que se encuentra en un tejido diferenciado que puede autorenovarse (clonal) y diferenciarse (con ciertas limitaciones) para producir todos los tipos de células especializadas del tejido del que se originó.

El término "células madre embrionarias", en la técnica también se abrevia como "células ES" o ESC (o si es de origen humano "células hES" o "hESC") como se usa en la presente memoria generalmente es entendido por el experto y se refiere a células madre embrionarias pluripotentes (PESC) que se derivan de la masa celular interna de un blastocisto. La persona experta entiende cómo obtener tales células madre embrionarias, por ejemplo, según lo descrito por Chung (Chung et al (2008) Stem Cell Lines, Vol 2(2):113-117), que emplea una técnica que no causa la destrucción del (de los) embrión (es) donante (s).

El término "pluripotencia", como se usa en la presente memoria, generalmente es entendido por un experto y se refiere a un atributo de una célula madre pluripotente que tiene el potencial de diferenciarse en todas las células que constituyen uno o más tejidos u órganos, por ejemplo, cualquiera de las tres capas germinales: endodermo (por ejemplo, revestimiento interior del estómago, tracto gastrointestinal, pulmones), mesodermo (por ejemplo, corazón, músculo, hueso, sangre, tracto urogenital) o ectodermo (por ejemplo, tejidos epidérmicos y sistema nervioso).

El término "células madre embrionarias pluripotentes", que se abrevia "PESC", como se usa en la presente memoria, se refiere a células madre pluripotentes derivadas de embriones tempranos. PESC se pueden diferenciar en células derivadas de cualquiera de las tres capas germinales. Las PESC se pueden distinguir de

otros tipos de células mediante el uso de marcadores o marcadores específicos de linaje que incluyen, pero no se limitan a, Oct-4, Nanog, GCTM-2, SSEA3, y SSEA4.

El término "células madre pluripotentes inducidas", comúnmente abreviado como iPSC, como se usa en la presente memoria se refiere a células somáticas (adultas) reprogramadas para entrar en un estado similar a las células madre embrionarias al verse obligadas a expresar factores importantes para mantener la "pluripotencialidad" de células madre embrionarias. Por lo general, las iPSC se preparan artificialmente a partir de una célula no pluripotente (esto es, células somáticas adultas o células diferenciadas terminalmente), tal como fibroblastos, células hematopoyéticas, miocitos, neuronas, células epidérmicas o similares, mediante la introducción en o de lo contrario poner en contacto la célula con factores de reprogramación. El término "células madre pluripotentes inducidas (iPSC)" no incluye células madre embrionarias.

El término "compuestos similares a la hormona tiroidea", como se usa en la presente memoria, se refiere a la hormona tiroidea (también denominada triyodotironina (T3)) así como a compuestos que son análogos a la hormona tiroidea T3 o imitan las acciones de la hormona tiroidea T3. Los ejemplos no limitantes de los compuestos similares a la hormona tiroidea incluyen compuestos agonistas del receptor de la hormona tiroidea tal como DITPA (también conocido como ácido 3,5-diyodotiropropiónico o DITPA), compuestos GC-1 (que es un agonista selectivo subtipo beta del receptor de la hormona tiroidea (TRbeta) de Bristol-Myers Squibb), compuestos RO (que es un agonista selectivo del subtipo de receptor de hormona tiroidea beta 1 (TRbeta) de Roche Pharmaceuticals), compuesto CO23 (que es un agonista selectivo del subtipo de hormona tiroidea alfa 1 (TRalpha1) de KaroBio), KB2115 (que es un agonista selectivo del subtipo beta del receptor de la hormona tiroidea (THbeta) de KaroBio).

En la presente invención, el término "proliferación" o "multiplicación" o "expansión" como se usa en la presente memoria se refiere a un procedimiento biológico en el que una PESC o una iPSC (la célula madre) crece y se divide para producir dos PESC o dos células iPSC ("células hijas") y así sucesivamente en un procedimiento exponencial en condiciones de control en cultivo *in vitro*. Durante el procedimiento de proliferación o expansión o multiplicación de PESC o iPSC, se entiende que una PESC o una iPSC se autorrenueva. La autorrenovación de una célula es la capacidad de una célula determinada de pasar por numerosos ciclos de división celular mientras se mantiene un estado indiferenciadas.

En la presente invención, el término 'diferenciación' como se usa en la presente memoria se refiere a un procedimiento biológico mediante el cual una PESC o iPSC no especializado adquiere las características de una célula especializada tal como una célula cardíaca (por ejemplo, cardiomiocito), célula hepática o célula muscular. bajo condiciones controladas en cultivo *in vitro*. La diferenciación está controlada por la interacción de los genes de una célula con las condiciones físicas y químicas fuera de la célula, generalmente a través de vías de señalización que implican proteínas incrustadas en la superficie celular. En ciertas realizaciones, las células madre pluripotentes (por ejemplo, PESC o iPSC) se pueden exponer a las composiciones y procedimientos de medio de cultivo de la invención para promover la diferenciación de las células madre pluripotentes en cardiomiocitos de tipo fetal. La diferenciación cardíaca se puede detectar mediante el uso de marcadores seleccionados, pero no se limitan a, NKX2-5, GATA4, cadena pesada de miosina, cadena ligera de miosina, alfa-actinina, troponina y tropomiosina (Burridge et al (2012) Stem Cell, Vol.10(1):16-28, US2013/0029368).

La persona experta conoce diversos procedimientos para obtener células madre, por ejemplo, PESC- y/o iPSC), cardiomiocitos derivados. Cuando las células madre se eliminan de las condiciones de supresión de diferenciación y/o cuando se cultivan en agregados en suspensión, llamados cuerpos embrioides, se produce una diferenciación espontánea a las células de las tres capas germinales. Los cardiomiocitos se originan a partir de la capa germinal mesodérmica y la diferenciación de las células madre en cardiomiocitos requiere, de este modo, una diferenciación eficiente hacia el linaje mesodérmico. Tal diferenciación dirigida hacia el linaje cardíaco se logra principalmente mediante varias estrategias, incluida la formación de cuerpos embrioides en presencia de factores de crecimiento y represores que se sabe que influyen en el desarrollo del corazón (véase, por ejemplo, Kehat et al. Clin. Invest. 2001; 108, 407-414), dependencia de la influencia del endodermo en la diferenciación cardíaca durante la embriogénesis (Mummery et al., Circulation. 2003; 107, 2733-2740), por ejemplo, mediante el cocultivo de células madre con el ratón END-2 para obtener cardiomiocitos derivados de células madre, o mediante el uso de cultivos en monocapa a alta densidad de células madre sembradas en Matrigel con tratamiento secuencial con activina A y BMP4 (Laflamme et al. 2007; Nat. Biotechnol. 25, 1015-1024).

El término "indiferenciada", como se usa en la presente memoria, se refiere a una PESC y/o iPSC, que no ha desarrollado una característica de una célula más especializada. Como reconocerá un experto en la técnica, los términos "indiferenciada" y "diferenciada" son relativos entre sí. Una PESC y/o iPSC, que está "diferenciada" tiene la característica de una célula más especializada. Las células diferenciadas e indiferenciadas se distinguen entre sí por varios criterios bien establecidos, que incluyen características morfológicas tales como tamaño y forma relativos, proporción de volumen nuclear a volumen citoplasmático; y características de expresión tales como la presencia detectable de marcadores de diferenciación (gen) conocidos.

En la presente invención, el término 'maduración' como se usa en la presente memoria se refiere a un procedimiento biológico en el que se requiere una célula diferenciada derivada de PESC o iPSC que exhiba un

estado inmaduro (o estado fetal) de desarrollo para lograr un desarrollo más funcional o estado de desarrollo completamente funcional (incluyendo genético y morfológico) bajo condiciones controladas en cultivo *in vitro*. Por lo tanto, la maduración de los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC puede ir acompañada de la pérdida de la expresión fetal de genes/proteínas, características morfológicas fetales y características funcionales asociadas, y la adquisición de la expresión génica, características morfológicas y características funcionales asociadas con células adultas (o de tipo adulto) o maduras. El procedimiento de "maduración" de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC conduce a cardiomiocitos derivados de PESC y/o iPSC con un estado de desarrollo más de tipo adulto o maduro.

El término "cardiomiocitos" o "miocitos cardíacos" como se usa en la presente memoria se refiere generalmente a cualquier célula de linaje de cardiomiocitos, y se puede considerar que se aplica a las células en cualquier etapa de la ontogenia de cardiomiocitos, a menos que se especifique lo contrario. Por ejemplo, los cardiomiocitos pueden incluir células precursoras de cardiomiocitos (cardiomiocitos inmaduros o cardiomiocitos fetales) y cardiomiocitos maduros (cardiomiocitos de tipo adulto). Además, los cardiomiocitos se pueden subdividir en subtipos que incluyen, pero no se limitan a, cardiomiocitos auriculares, cardiomiocitos ventriculares, cardiomiocitos nodales del nodo sinoauricular (SA), cardiomiocitos nodales SA periféricos o cardiomiocitos nodales SA centrales.

El término "cardiomiocitos de tipo fetal" o "cardiomiocitos inmaduros" como se usa en la presente memoria se refiere a un cardiomiocito derivado de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro*, que no posee el fenotipo y/o genotipo deseado en proporción con un adulto o cardiomiocito de tipo adulto. Por ejemplo, tales cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal pueden exhibir automaticidad (contracción espontánea) y/o expresión de canales iónicos de tipo fetal, y/o señales electrofisiológicas de tipo fetal, y/o patrones de expresión génica de tipo fetal, y/o fenotipos físicos de tipo fetal. Los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal pueden, por ejemplo, distinguirse de otros tipos de células mediante el uso de marcadores o marcadores específicos de linaje, incluyendo, pero no se limitan a, MYH6, TNNT2, TNNI3, MLC2V, EMILIN2, SIRPA, VECAM, y otros marcadores apropiados para evaluar una etapa de desarrollo fetal o de tipo fetal (Burridge et al (2012) Stem Cell Cell, Vol.10(1):16-28). La madurez metabólica se puede determinar mediante procedimientos conocidos para el experto, por ejemplo, procedimientos que analizan el fenotipo, la morfología, la expresión génica, los marcadores metabólicos, los marcadores de la superficie celular, las características electrofisiológicas y/o el ensayo funcional celular de la célula. Por ejemplo, para la maduración, se puede determinar la expresión disminuida de genes asociados con un estado "fetal" o estado hipertrófico cardíaco, tal como, por ejemplo, NPPA (BNA) y NPPB (BNP), o preferiblemente, determinar las características electrofisiológicas de los cardiomiocitos derivados de células madre en maduración, y en los que se puede ver una característica de cardiomiocitos más adultos o de tipo adulto para cardiomiocitos derivados de células madre más maduros, como se discute en detalle en la presente memoria.

Además, la madurez relativa de los cardiomiocitos derivados de células madre se puede determinar por la presencia de una disminución de la expresión de genes asociados con un estado fetal, tal como NPPA, NPPB, actina de músculo liso y actina esquelética, o la expresión creciente de genes/proteínas adultos, tales como la cadena ligera de miosina 2V, calsequestrina y receptor de rianodina).

El término "cardiomiocitos de tipo adulto" o "cardiomiocitos maduros", como se usa en la presente memoria, se refiere a cardiomiocitos que poseen el fenotipo y/o genotipo deseado en proporción con un cardiomiocito adulto. En una realización, una célula madura tiene el fenotipo y/o el genotipo de, pero no se limita a, un cardiomiocito adulto o cardiomiocito auricular o cardiomiocito ventricular o cardiomiocito nodal SA o cardiomiocito nodal SA periférico o cardiomiocito nodal SA central. En otras realizaciones, los "cardiomiocitos de tipo adulto" o los "cardiomiocitos maduros" exhiben patrones de electrofisiología más maduros y/o patrones de manejo de calcio más maduros, y/o más expresión de canales iónicos de tipo adulto, y/o más señales electrofisiológicas de tipo adulto, y/o más propiedades contráctiles de tipo adulto, y/o más patrones de expresión génica de tipo adulto, y/o más fenotipos físicos (morfológicos) de tipo adulto en comparación con cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro*. Los cardiomiocitos de tipo adulto también pueden albergar un mayor grado de organización de miofibrillas y estrías sarcoméricas, que son características que se desarrollan de manera pobre o insuficiente en los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro*.

La persona experta sabe cómo evaluar la madurez de PESC y/o cardiomiocitos derivados de iPSC en cultivo *in vitro*, por ejemplo, usando marcadores específicos de cardiomiocitos o marcadores específicos de linaje relevantes para una etapa de desarrollo particular, así como procedimientos disponibles en la técnica para distinguir los cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto de los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal. En la presente invención, una forma de evaluar la madurez de un cardiomiocito derivado de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* es evaluar la expresión de marcadores genéticos asociados con el estado fetal (inmaduro) tal como (pero no limitado a) NPPA, NPPB, actina del músculo liso y actina esquelética. La expresión (gen) disminuida de uno o más de dichos marcadores fetales (inmaduros) sería indicativo de un estado de tipo adulto (maduro). Otra forma de evaluar la madurez de cardiomiocitos derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* es evaluar la expresión de marcadores genéticos asociados con el estado de tipo adulto (maduro) tal como (pero no limitado a) la

cadena ligera de miosina 2V, receptor de calsequestrina y rianodina. El aumento de la expresión (gen) de uno o más de dichos marcadores de tipo adulto (maduro) sería indicativo de un estado de tipo adulto (maduro) (Burridge et al (2012), Stem Cell, Vol.10(1):16-28).

5 Otra forma de evaluar la madurez de un cardiomiocito derivado de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* es evaluar sus propiedades electrofisiológicas, por ejemplo, la capacidad de una célula para generar y/o propagar un potencial de acción *in vitro*. La madurez electrofisiológica de cardiomiocitos derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* se puede evaluar, por ejemplo, mediante técnicas patch-clamp, entre otras técnicas. Los cambios que son indicativos de un fenotipo electrofisiológico de tipo adulto (maduro), en comparación con un fenotipo electrofisiológico de tipo fetal (inmaduro), incluyen (pero no se limitan a) aumento de la velocidad máxima de despolarización, potencial de membrana en reposo disminuido y mayor amplitud del potencial de acción, que son características de un cardiomiocito adulto.

10 Otra forma de evaluar la madurez de un cardiomiocito derivado de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* es evaluar su perfil metabólico, por ejemplo, la actividad mitocondrial en cultivo *in vitro*. La madurez del perfil metabólico de un cardiomiocito derivado de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* se puede evaluar, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo TMRM (entre otras técnicas), que usa el éster metílico de tetrametilrodamina fluorescente rojo colorante potenciométrico, comúnmente conocido como TMRM. El tratamiento con TMRM da como resultado una acumulación de TMRM impulsada por el potencial de la membrana mitocondrial dentro de la región de la membrana interna de las mitocondrias de funcionamiento saludable. Un ejemplo no limitante de un cambio característico indicativo de un perfil metabólico de tipo adulto (maduro), en comparación con un perfil metabólico de tipo fetal (inmaduro), es la mayor acumulación de TMRM en las mitocondrias de cardiomiocitos de tipo adulto (maduro) derivado de PESC y/o iPSC de tipo fetal (inmaduro), que se detecta mediante un aumento de la fluorescencia naranja asociada a TMRM en el ensayo TMRM.

15 Otra forma de evaluar la madurez de un cardiomiocito derivado de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* es evaluar sus características morfológicas, por ejemplo, la forma y/o la organización ultraestructural del citoesqueleto. La madurez de las características morfológicas de un cardiomiocito derivado de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* puede evaluarse, por ejemplo, mediante técnicas de inmunohistoquímica (entre otras técnicas), por ejemplo, usando inmunofluorescencia (Cy3 o Alexa-Fluor 647) y anticuerpos dirigidos contra constituyentes integrales del citoesqueleto, por ejemplo alfa-actinina. Ejemplos no limitantes de cambios característicos indicativos de características morfológicas de tipo adulto (maduros), en comparación con un perfil metabólico de tipo adulto (inmaduro), es la mayor polarización de las células, la organización sarcomérica mejorada y la forma alargada.

20 En la presente invención, el término "marcadores" o "marcadores específicos de linaje", como se usa en la presente memoria, se refiere a una característica específicamente asociada con el fenotipo de células de un linaje de interés y se puede usar para evaluar la diferenciación de una célula no comprometida al linaje de interés. Por ejemplo, los "marcadores" o "marcadores específicos de linaje" se pueden referir a moléculas de ácido nucleico o polipéptido que se expresan diferencialmente en una célula de interés. El nivel detectable del ácido nucleico marcador o polipéptido es suficientemente mayor o menor en las células de interés en comparación con otras células, de modo que la célula de interés se puede identificar y distinguir de otras células usando cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica.

25 El término composición acuosa, como se usa en la presente memoria, se refiere a una composición que está basada en agua o a una composición en la que el disolvente es agua. Por ejemplo, se puede obtener una composición acuosa disolviendo (cualquier) sustancia (s) soluble (s) en agua en agua.

30 El término "composición sólida", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier composición que esté en forma sólida. El término "composición sólida" también abarca composiciones, que están en forma semi-líquida o en forma semi-sólida. Por ejemplo, una composición sólida puede estar en forma de polvo, gránulo, comprimido, pasta, puré, mezcla húmeda, pellas, forma liofilizada, forma deshidratada por congelación y similares. En ciertas realizaciones de la presente invención, una composición sólida se puede disolver en una cantidad apropiada de disolvente, por ejemplo agua, para obtener una composición acuosa que se enseña en la presente memoria.

35 El término "lípidos" o "lípidos" como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo de moléculas que incluyen grasas, ceras, esteroides, vitaminas liposolubles (tales como vitaminas A, D, E y K), monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, fosfolípidos y otros. Los lípidos se pueden dividir en varias categorías que incluyen ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, sacarolípidos y policétidos (derivados de la condensación de subunidades cetoacilo); y lípidos de esteroides y lípidos prenol (derivados de la condensación de subunidades de isopreno). El término "lípidos" también abarca moléculas tales como los ácidos grasos y sus derivados (incluidos los tri-, di-, monoglicéridos y fosfolípidos), así como otros metabolitos que contienen esteroides tales como el colesterol. Otros ejemplos no limitantes de lípidos incluyen ácido linolénico, ácido linoleico y ácido palmítico, ácido araquidónico, acetato de DL-alfa-tocoferol, alcohol etílico, ácido mirístico, ácido oleico, ácido palmitoleico, plurónico F-68, ácido esteárico, interpolación 80, y otros. El término "mezcla de lípidos" como se usa en la presente memoria se refiere a la combinación de al menos dos o más lípidos.

El término "medio de cultivo libre de suero" como se usa en la presente memoria, generalmente es entendido por un experto y se refiere a un medio sustancialmente libre de suero. Por definición, el medio libre de suero carece de suero completo como ingrediente, pero puede no estar completamente libre de productos derivados del suero, por ejemplo, se puede incluir una forma altamente purificada de albúmina, por ejemplo, albúmina bovina o incluso humana (recombinante) en medio libre de suero. Por ejemplo, puede comprender hasta 10% en peso, preferiblemente hasta 5% en peso, incluso más preferiblemente hasta 2% en peso, hasta 1% en peso, hasta 0,5% en peso, o más preferiblemente hasta 0,25% en peso de albúmina, por ejemplo, Bovostar BSA de Bovogen (Williams Ave Keilor East VIC 3033, Australia). Las desventajas técnicas del uso del suero incluyen la naturaleza indefinida del suero, la variabilidad entre lotes en la composición y el riesgo de contaminación. Por la presencia de productos derivados del suero definidos como la albúmina altamente purificada, tales desventajas no se reintroducen en el medio libre de suero.

El término "mamífero", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier miembro de la clase Mammalia, que incluye, sin limitación, primates humanos y no humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de monos; animales de granja tales como vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio, incluidos roedores tales como ratones, ratas y cobayas, y similares. El término no denota una edad o sexo en particular. De este modo, los sujetos adultos y recién nacidos, así como los fetos, ya sean hombres o mujeres, se deben incluir dentro del alcance de este término.

Los términos "un", "una" y "el" en sus formas singulares como se usan en la presente memoria incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, un procedimiento para aislar "una" molécula de ADN, incluye aislar una pluralidad de moléculas (por ejemplo, 10, 100, 1000, 10, de miles, 100 de miles, millones o más moléculas).

El término "aproximadamente", como se usa en la presente memoria y a menos que se indique específicamente o sea obvio por el contexto, se entiende dentro de un intervalo de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo dentro de 2 desviaciones estándar de la media. Aproximadamente se puede entender como dentro del 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% o 0,01% del valor establecido.

El término 'y/o' como se usa en la presente memoria, se refiere a una situación en la que uno o más de los casos indicados pueden ocurrir, solos o en combinación con al menos uno de los casos indicados, hasta todos los casos indicados.

El término "al menos" como se usa en la presente memoria se refiere a una situación en la que un valor particular es igual a dicho valor particular o más. Por ejemplo, "al menos 2" se entiende que es lo mismo que "2 o más", esto es, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, ..., etc.

Los términos "que comprende" o "comprender" y sus conjugaciones, como se usan en la presente memoria, se refieren a una situación en la que dichos términos se usan en su sentido no limitante para significar que los elementos que siguen a la palabra están incluidos, pero los artículos no mencionados específicamente no están excluidos. También abarca el verbo más limitante "consistir en". Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno de los elementos, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "u" o "una" de este modo generalmente significa "al menos uno". Se entiende además que, cuando se hace referencia a "secuencias" en la presente memoria, generalmente se hace referencia a las moléculas físicas reales con una cierta secuencia de subunidades (por ejemplo, aminoácidos).

El término "técnicas convencionales", como se usa en la presente memoria, se refiere a una situación en la que los procedimientos para llevar a cabo las técnicas convencionales usadas en los procedimientos de la invención serán evidentes para el trabajador experto. La práctica de técnicas convencionales en biología molecular, bioquímica, el cultivo celular, la genómica, la secuenciación y los campos relacionados son bien conocidos para los expertos en la técnica y se discuten, por ejemplo, en las siguientes referencias bibliográficas: Human Embryonic Stem Cell: The Practical Handbook. Publisher: John Wiley & Sons, LTD, Editors (Sullivan, S., Cowan, C. A., Eggen, K.) Harvard University, Cambridge, MA, USA (2007); Human Stem Cell, a Laboratory Guide (2nd Edition) de Peterson, S., and Loring, J. F. (2012).

El término "términos científicos comunes", a menos que se defina lo contrario, como se usa en la presente memoria se refiere a términos técnicos y científicos usados en la presente memoria que tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica al que pertenece esta invención. Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2<sup>nd</sup> ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994); March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992); and Sambrook and Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, N.Y. 2001) proporcionan a un experto en la técnica una guía general de muchos de los términos usados en la presente solicitud. Un experto en la técnica reconocerá muchos procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, que se podrían usar

en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no se limita de ninguna manera a los procedimientos y materiales descritos.

Los términos "menos de" o "hasta" y similares, tal como se usan en la presente memoria, se refieren al intervalo desde cero hasta e incluyendo el valor proporcionado. Por ejemplo, "menos de 10" o "hasta 10" se entiende como 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10.

A lo largo de la presente divulgación, cuando se hace una mención, por ejemplo, del término "2,5 microgramos/ml de colesterol", los expertos entienden que "2,5 microgramos/ml de colesterol" significa 2,5 microgramos de colesterol por ml de medio de cultivo.

Como se usa en la presente memoria, el término "cultivo tridimensional" es generalmente entendido por el experto en la técnica y se refiere a un procedimiento de cultivo de células en el que las células se implantan o siembran en una estructura artificial capaz de soportar la formación de tejido tridimensional. Estas estructuras, por lo general llamadas andamios, son críticas tanto *ex vivo* como *in vitro*, para recapitular el medio *in vivo* y permitir que las células influyan en sus propios microambientes.

Como se usa en la presente memoria, el término "solución isotónica" se refiere a una solución en la que su concentración eficaz de osmolar es la misma que la concentración de soluto de otra solución u otra célula y/o tejido con el que se compara. Esto ocurre, por ejemplo, cuando la concentración de las moléculas de agua y soluto total son las mismas en una solución externa que en el contenido celular. Las moléculas de agua se difunden a través de la membrana plasmática en ambas direcciones, y como la velocidad de difusión del agua es la misma en ambas direcciones, esa célula no ganará ni perderá agua. En la presente invención, una composición isotónica se refiere a una solución en la que la concentración de moléculas tanto de agua y soluto total son las mismas en una solución externa que en el contenido celular de la célula que se conserva, transpone o almacena en la composición de la presente invención o como en el contenido celular de las células que forman parte de un tejido y/u órgano que se conserva, transpone y/o almacena en la composición de la presente invención.

Como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal vertebrado, pero por lo general se referirá a un mamífero, por ejemplo un paciente humano, un animal domesticado (tal como un perro o un gato), un animal de granja (tal como un caballo, vaca u oveja) o un animal de laboratorio (tal como ratas, ratones, primates no humanos o cobayas). En realizaciones preferidas, el sujeto es humano, preferiblemente un humano adulto.

### 30 **Composiciones de medio de cultivo de la invención.**

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición de medio de cultivo acuoso a base de agua. En particular, la invención se refiere a una composición de medio de cultivo, en el que dicha composición de medio de cultivo está esencialmente libre de suero y comprende un compuesto similar a la hormona tiroidea, una mezcla de lípidos; y un compuesto de carnitina.

En la preparación de las composiciones de medio de cultivo de la presente invención, puede ser particularmente ventajoso usar un medio libre de suero (definido químicamente) para evitar la variación de suero de lote a lote en su capacidad para soportar la maduración y el mantenimiento de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC- y/o iPSC en cultivo *in vitro*. El uso de un medio de cultivo libre de suero (definido químicamente) también es ventajoso para garantizar la reproducibilidad de los resultados y mantener el rendimiento y la calidad de las células de cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto obtenidas de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC maduros en cultivo *in vitro*. El uso de un medio de cultivo libre de suero (definido químicamente) también es deseable para evitar el riesgo de contaminación potencial de patógenos y para disminuir la inmunogenicidad de los cardiomiocitos de tipo adulto generados a partir de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC- y/o iPSC en cultivo *in vitro*. Los medios de cultivo libre de suero definidos químicamente son bien conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. La persona experta sabe cómo seleccionar un medio de cultivo libre de suero apropiado (definido químicamente) para la preparación de las composiciones de medio de cultivo de la invención. Los ejemplos no limitantes de medios de cultivo libre de suero disponibles en el mercado y (definidos químicamente) incluyen, mezcla de nutrientes F-12 (Ham), F-10 nutrient mixture, Leibovitz L-15, McCoy's 5A, MCDB 131, GMEM, MEM mejorado, DMEM, DMEM/F12, RPMI-1640, Waymouth's MB 752/1, medio E de Williams, IMDM, Medio 199, Opti-MEM, Medio Eagle modificado (MEM), Medio mínimo esencial (MEM), BGJb (Modificación Fitton-Jackson), CMRL, BME. Se puede emplear una mezcla de uno o más medios libres de suero químicamente especificados en las composiciones de medio de cultivo de la presente invención. Un ejemplo no limitante de una mezcla de dos medios de cultivo libres de suero químicamente especificados es, por ejemplo, una mezcla que comprende IMDM y nutriente F12 (Ham). Se demostró que dicha mezcla era particularmente apropiada para la preparación de las composiciones de medio de cultivo de la presente invención.

El presente inventor descubrió que la adición de un compuesto similar a la hormona tiroidea en las composiciones del medio de cultivo de la invención promueve y mejora en gran medida la maduración de los

cardiomiocitos obtenidos a partir de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de iPSC en cultivo *in vitro*. Específicamente, se descubrió que la exposición de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* a al menos un compuesto de hormona de tipo tiroideo dio como resultado una maduración mejorada de atributos electrofisiológicos y mecánicos (por ejemplo, potencial de acción de tipo adulto, potencial de membrana en reposo inferior y contracciones rítmicas más fuertes de las células musculares cardíacas). Maduración mejorada de la homeostasis del calcio (esto es, corrientes de calcio), maduración mejorada de la organización ultraestructural de los cardiomiocitos (esto es, apariencia de un patrón estriado organizado y forma alargada que se asemeja al fenotipo del adulto), y también se pueden detectar maduración mejorada de otras características propias de un fenotipo de cardiomiocitos (maduros) adulto o de tipo adulto tal como el perfil metabólico (por ejemplo, actividad mitocondrial mejorada) y la detección de marcadores genéticos específicos de la etapa adulta, tal como troponina I y alfa actinina y similares).

El presente inventor también descubrió sorprendentemente que la adición de al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea en las composiciones del medio de cultivo de la invención mejoró la supervivencia de los cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto generados a partir de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de iPSC en cultivo *in vitro* en comparación con una situación en la que no hay ningún compuesto similar a la hormona tiroidea en las composiciones de medio de cultivo de la invención. Se observó que este efecto también aumentó globalmente el rendimiento de cardiomiocitos de tipo adulto generados a partir de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de iPSC en cultivo *in vitro*, obtenibles por el procedimiento de la presente invención.

Los compuestos similares a la hormona tiroidea apropiados para la preparación del medio de cultivo de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, T3, T4 (que es una hormona tiroidea que se puede convertir en T3 por la 5'-yodinasas, véase a continuación), DITPA y compuestos agonistas de la hormona tiroidea tales como, por ejemplo, el compuesto GC-1, el compuesto RO, el compuesto CO23, el compuesto KB2115 y similares. T3 es una hormona de origen natural a base de tirosina producida por la glándula tiroides, que se produce durante la ontogénesis. Otra forma de hormona tiroidea en la sangre es la tiroxina (T4), que tiene una vida media más larga que la T3. La proporción de T4 a T3 liberada en la sangre es de aproximadamente 20 a 1. T4 se convierte en el T3 activo (tres a cuatro veces más potente que T4) dentro de las células por las deiodinasas (5'-yodinasas). T3 y T4 son bien conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente.

En una realización, el compuesto de hormona similar a la tiroides es triiodotironina (T3) y/o ácido 3,5-diiodotiropropiónico (DITPA).

En una realización, la composición de medio de cultivo de la invención comprende desde aproximadamente 1,0 a aproximadamente 150 ng/ml del compuesto similar a la hormona tiroidea, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 125 ng/ml del compuesto similar a la hormona tiroidea, preferiblemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 100 ng/ml del compuesto similar a la hormona tiroidea, preferiblemente de aproximadamente 30 a aproximadamente 75 ng/ml del compuesto similar a la hormona tiroidea, preferiblemente de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 ng/ml del compuesto similar a la hormona tiroidea, preferiblemente de aproximadamente 53 a aproximadamente 55 ng/ml del compuesto similar a la hormona tiroidea.

Por ejemplo, los ejemplos no limitantes de concentración para el compuesto similar a la hormona tiroidea que se puede usar en la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria y/o en el procedimiento que se enseña en la presente memoria y/o en el kit que se enseña en la presente memoria pueden incluir aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 500 ng/ml del compuesto similar a la hormona tiroidea, preferiblemente aproximadamente 0,001 a aproximadamente 400 ng/ml del compuesto similar a la hormona tiroidea, preferiblemente aproximadamente 0,05 a aproximadamente 300 ng/ml del compuesto similar a la hormona tiroidea, preferiblemente aproximadamente 0,075 a aproximadamente 200 ng/ml del compuesto similar a la hormona tiroidea, más preferiblemente de aproximadamente 0,09 a aproximadamente 110 ng/ml del compuesto similar a la hormona tiroidea.

En una realización, la composición de medio de cultivo de la invención comprende aproximadamente 25 a aproximadamente 150 ng/ml del compuesto similar a la hormona tiroidea.

En una realización preferida, la composición del medio de cultivo de la invención comprende aproximadamente 50 ng/ml del compuesto similar a la hormona tiroidea, por ejemplo 40 a 60 ng/ml del compuesto similar a la hormona tiroidea. // pct

En una realización, la composición de medio de cultivo de la invención comprende de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 150 ng/ml de T3, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 125 ng/ml de T3, preferiblemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 100 ng/ml de T3, preferiblemente de aproximadamente 30 a aproximadamente 75 ng/ml de T3, preferiblemente de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 ng/ml de T3, preferiblemente de aproximadamente 53 a aproximadamente 55 ng/ml de T3.

- Por ejemplo, los ejemplos no limitantes de concentración para el compuesto similar a la hormona tiroidea que se puede usar en la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria y/o en el procedimiento que se enseña en la presente memoria y/o en el kit que se enseña en la presente memoria pueden incluir aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 500 ng/ml de T3, preferiblemente de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 400 ng/ml de T3, preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 300 ng/ml de T3, preferiblemente de aproximadamente 0,075 a aproximadamente 200 ng/ml de T3, más preferiblemente aproximadamente 0,09 a aproximadamente 110 ng/ml de T3.
- En una realización, la composición del medio de cultivo de la invención comprende aproximadamente 25 a aproximadamente 150 ng/ml de T3.
- En una realización preferida, la composición del medio de cultivo de la invención comprende aproximadamente 50 ng/ml de T3, por ejemplo 40 a 60 ng/ml de T3.
- En una realización, la composición del medio de cultivo de la invención comprende aproximadamente 25 ng/ml a aproximadamente 150 ng/ml de T3 y/o aproximadamente 1 microM a aproximadamente 2 microM de DITPA.
- En una realización, la composición del medio de cultivo de la presente invención comprende al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea seleccionado del grupo que consiste en T3 y DITPA.
- En una realización de la invención, T3 y DITPA se pueden usar indistintamente o en combinación en las composiciones de medio de cultivo y/o el procedimiento de la invención. En una realización preferida, T3 se usa en las composiciones de medio de cultivo y/o los procedimientos de la invención.
- En otra realización, T3 y/o DITPA se pueden usar en combinación con uno o más compuestos similares a la hormona tiroidea seleccionados de T4, compuestos agonistas de la hormona tiroidea tales como, por ejemplo, compuesto GC-1, compuesto RO, compuesto CO23, compuesto KB2115, y similares.
- En otra realización, la composición de medio de cultivo de la invención comprende de aproximadamente 0,01 nM a 10 microM de DITPA, preferiblemente de aproximadamente 0,1 nM a 8 microM de DITPA, preferiblemente de aproximadamente 0,2 nM a 6 microM de DITPA, preferiblemente de 0,3 nM a 5 microM de DITPA, preferiblemente de aproximadamente 0,4 nM a 4 microM de DITPA, preferiblemente de aproximadamente 0,5 nM a 3 microM de DITPA, preferiblemente de aproximadamente 0,6 nM a 2 microM de DITPA, más preferiblemente de aproximadamente 0,75 nM a 1,5 microM de DITPA.
- En una realización, la composición del medio de cultivo de la invención comprende al menos aproximadamente 1 nM de DITPA, preferiblemente aproximadamente 1 microM de DITPA, pero preferiblemente no más de aproximadamente 10 microM de DITPA.
- En una realización preferida, la composición de la invención comprende aproximadamente 0,1 a 100 ng/ml de T3 y aproximadamente 1 nM a 1 microM de DITPA.
- En una realización, las composiciones de medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria pueden comprender tanto T3 como DITPA. Las cantidades apropiadas o la concentración de T3 y DITPA se pueden determinar por la persona experta, en base a la información divulgada en la presente memoria. Por ejemplo, las concentraciones apropiadas para T3 y DITPA pueden ser al menos aproximadamente 0,1 ng/ml de T3 y al menos aproximadamente 1 nM de DITPA, más preferiblemente aproximadamente 100 ng/ml de T3 y aproximadamente 1 microM de DITPA. Otro ejemplo de concentraciones apropiadas puede ser al menos aproximadamente 25 ng/ml de T3 y al menos aproximadamente 1 nM de DITPA, más preferiblemente aproximadamente 50 ng/ml de T3 y aproximadamente 1 microM de DITPA.
- Otros compuestos similares a la hormona tiroidea, derivados de la hormona tiroidea y precursores de la hormona tiroidea también se pueden usar para preparar la composición del medio de cultivo según la invención que se enseña en la presente memoria, pero son preferibles T3 y/o DITPA. La persona experta también sabe cómo seleccionar compuestos similares a la hormona tiroidea apropiados y eficaces, derivados de la hormona tiroidea y precursores de la hormona tiroidea, y sabe cómo determinar las dosis eficaces en base a la información divulgada en la presente memoria.
- En una realización, la mezcla de lípidos comprende colesterol y uno o más lípidos seleccionados de ácido linolénico, ácido linoleico y ácido palmítico.
- El presente inventor ha descubierto que la adición de una mezcla de lípidos a la composición de medios de cultivo que se enseña en la presente memoria es beneficiosa para el cultivo y la maduración de cardiomiocitos de tipo fetal, derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro*, en forma de adulto (madura) y mantener dichos cardiomiocitos de tipo adulto durante un período prolongado de tiempo en un medio de cultivo *in vitro*. Sin limitarse a ninguna teoría, se cree que la adición de una mezcla de lípidos (químicamente definida) en la composición del medio de cultivo de la invención hace que dicho medio de cultivo sea más concordante con el entorno natural *in vivo* en el que el feto derivado de PESC (inmaduro) ) cardiomiocitos y/o cardiomiocitos

- (inmaduros) de tipo fetal derivados de iPSC maduran en cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto. El presente inventor ha descubierto que la presencia de una mezcla de lípidos definida químicamente en la composición de medios de cultivo de la invención optimiza la maduración y supervivencia de los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de iPSC en cultivo *in vitro*.
- 5 La presencia de una mezcla de lípidos químicamente definida en las composiciones de medio de cultivo de la presente invención parece particularmente ventajosa para apoyar y acomodar los cambios en el metabolismo energético (esto es, el metabolismo mitocondrial) que se producen en los cardiomiocitos maduros generados a partir de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados del PESC y/o cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de iPSC en cultivo *in vitro*.
- 10 En una realización preferida, la mezcla de lípidos comprende colesterol, ácido linolénico, ácido linoleico y ácido palmítico. El colesterol, el ácido linolénico y el ácido linoleico son bien conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente.
- En una realización, el medio de cultivo de la composición de la invención comprende aproximadamente 1 microgramo/ml a aproximadamente 4 microgramos/ml de colesterol.
- 15 En una realización, el medio de cultivo de la composición de la invención comprende de aproximadamente 0,01 a 5 microgramos/ml de colesterol, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 4,5 microgramos/ml de colesterol, preferiblemente de aproximadamente 1,0 a 4,0 microgramos/ml de colesterol, preferiblemente aproximadamente 1,5 a 3,0 microgramos/ml de colesterol, más preferiblemente aproximadamente 2,0 a 2,5 microgramos/ml de colesterol.
- 20 En una realización de la invención, la composición del medio de cultivo comprende de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 microgramos/ml de ácido linolénico, preferiblemente de aproximadamente 0,04 a aproximadamente 18 microgramos/ml de ácido linolénico, preferiblemente de aproximadamente 0,06 a aproximadamente 16 microgramos/ml de ácido linolénico, preferiblemente de aproximadamente 0,08 a aproximadamente 14 microgramos/ml de ácido linolénico, preferiblemente de aproximadamente 0,09 a
- 25 aproximadamente 12 microgramos/ml de ácido linolénico, preferiblemente de aproximadamente 0,095 a aproximadamente 11 microgramos/ml de ácido linolénico, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 microgramos/ml de ácido linolénico.
- Por ejemplo, los ejemplos no limitantes de concentración para el ácido linolénico que se pueden usar en la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria y/o en el procedimiento que se enseña
- 30 en la presente memoria y/o en el kit que se enseña en la presente memoria pueden incluir aproximadamente 0,001 a 0,5 microgramos/ml de ácido linolénico, preferiblemente de aproximadamente 0,005 a 0,4 microgramos/ml de ácido linolénico, preferiblemente de aproximadamente 0,0075 a 0,3 microgramos/ml de ácido linolénico, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 0,2 microgramos/ml de ácido linolénico, más preferiblemente de aproximadamente 0,075 a 0,15 microgramos/ml de ácido linolénico.
- 35 En una realización preferida, la composición del medio de cultivo comprende aproximadamente 0,1 microgramos/ml de ácido linolénico, por ejemplo 0,05 a 0,3 microgramos/ml de ácido linolénico.
- En una realización de la invención, la composición del medio de cultivo comprende de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 microgramos/ml de ácido linoleico, preferiblemente de aproximadamente 0,04 a aproximadamente 18 microgramos/ml de ácido linoleico, preferiblemente de aproximadamente 0,06 a
- 40 aproximadamente 16 microgramos/ml de ácido linoleico, preferiblemente de aproximadamente 0,08 a aproximadamente 14 microgramos/ml de ácido linoleico, preferiblemente de aproximadamente 0,09 a aproximadamente 12 microgramos/ml de ácido linoleico, preferiblemente de aproximadamente 0,095 a aproximadamente 11 microgramos/ml de ácido linoleico, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 microgramos/ml de ácido linoleico.
- 45 Por ejemplo, los ejemplos no limitantes de concentración para el ácido linoleico que se pueden usar en la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria y/o en el procedimiento que se enseña en la presente memoria y/o en el kit que se enseña en la presente memoria pueden incluir aproximadamente 0,001 a 0,5 microgramos/ml de ácido linoleico, preferiblemente de aproximadamente 0,005 a 0,4 microgramos/ml de ácido linoleico, preferiblemente de aproximadamente 0,0075 a 0,3 microgramos/ml de ácido linoleico,
- 50 preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 0,2 microgramos/ml de ácido linoleico, más preferiblemente de aproximadamente 0,075 a 0,15 microgramos/ml de ácido linoleico.
- En una realización preferida, la composición del medio de cultivo comprende aproximadamente 0,1 microgramos/ml de ácido linoleico, por ejemplo 0,05 a 0,3 microgramos/ml de ácido linoleico.
- 55 En una realización de la invención, la composición del medio de cultivo comprende de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 microgramos/ml de ácido palmítico, preferiblemente de aproximadamente 0,04 a aproximadamente 18 microgramos/ml de ácido palmítico, preferiblemente de aproximadamente 0,06 a aproximadamente 16 microgramos/ml de ácido palmítico, preferiblemente de aproximadamente 0,08 a

aproximadamente 14 microgramos/ml de ácido palmítico, preferiblemente de aproximadamente 0,09 a aproximadamente 12 microgramos/ml de ácido palmítico, preferiblemente de aproximadamente 0,095 a aproximadamente 11 microgramos/ml de ácido palmítico, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 microgramos/ml de ácido palmítico.

5 Por ejemplo, los ejemplos no limitantes de concentración para el ácido palmítico que se pueden usar en la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria y/o en el procedimiento que se enseña en la presente memoria y/o en el kit que se enseña en la presente memoria pueden incluir aproximadamente 0,001 a 0,5 microgramos/ml de ácido palmítico, preferiblemente de aproximadamente 0,005 a 0,4 microgramos/ml de ácido palmítico, preferiblemente de aproximadamente 0,0075 a 0,3 microgramos/ml de ácido  
10 palmítico, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 0,2 microgramos/ml de ácido palmítico, más preferiblemente de aproximadamente 0,075 a 0,15 microgramos/ml de ácido palmítico.

En una realización preferida, la composición del medio de cultivo comprende aproximadamente 0,1 microgramos/ml de ácido palmítico, por ejemplo, 0,05 a 0,3 microgramos/ml de ácido palmítico.

15 En una realización, el inventor descubrió que una composición de medio de cultivo de la presente invención es particularmente eficaz en la maduración de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto en cultivo *in vitro* cuando dicho la composición del medio de cultivo comprende aproximadamente 2,2 microgramos/ml de colesterol, aproximadamente 0,1 microgramos/ml de ácido linolénico, aproximadamente 0,1 microgramos/ml de ácido linoleico y aproximadamente 0,1 microgramos/ml de  
20 ácido palmítico, en comparación con una situación en la que las composiciones del medio de cultivo de la invención carece de esta mezcla de lípidos particular.

En una realización, puede ser ventajoso, aunque no esencial, agrandar la mezcla de lípidos agregando otros lípidos a las composiciones de medio de cultivo de la invención.

25 En una realización, la mezcla de lípidos puede comprender además uno o más componentes seleccionados del grupo de ácido araquidónico, acetato de DL-alfa-tocoferol, alcohol etílico, ácido mirístico, ácido oleico, ácido palmitoleico, plurónico F-68, ácido esteárico, y Tween 80.

30 En una realización, la mezcla de lípidos puede comprender además dos o más lípidos seleccionados de ácido araquidónico, acetato de DL-alfa-tocoferol, alcohol etílico, ácido mirístico, ácido oleico, ácido palmitoleico, plurónico F-68, ácido esteárico y Tween 80. El presente inventor ha encontrado que la adición, en las composiciones del medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria, de dos o más lípidos seleccionados de ácido araquidónico, acetato de DL-alfa-tocoferol, alcohol etílico, ácido mirístico, ácido oleico, ácido  
35 palmitoleico, plurónico F-68, ácido esteárico y Tween 80, dieron como resultado una composición de medio de cultivo que fue más eficiente en términos de su capacidad para promover y mejorar la maduración de los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* en comparación con una situación en la que la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria no contiene esta mezcla de lípidos particular.

En una realización preferida, la mezcla de lípidos comprende colesterol, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido palmítico, ácido araquidónico, acetato de DL-alfa-tocoferol, alcohol etílico, ácido mirístico, ácido oleico, ácido palmitoleico, plurónico F-68, ácido esteárico, y Tween 80.

40 El presente inventor descubrió que al agregar, en las composiciones del medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria, una mezcla de lípidos que comprende colesterol, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido palmítico, ácido araquidónico, acetato de DL-alfa-tocoferol, alcohol etílico, ácido mirístico, ácido oleico, ácido palmitoleico, plurónico F-68, ácido esteárico y Tween 80, produjeron efectos aún mayores en la maduración de los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro*, para obtener  
45 cardiomiocitos de tipo adulto (maduros), en comparación con una situación en la que las composiciones de medio de cultivo de la invención carecen de esta mezcla de lípidos particular.

50 La persona experta sabe cómo preparar una mezcla de lípidos apropiada usando la información divulgada en la presente memoria. La mezcla de lípidos químicamente definida que comprende colesterol, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido palmítico, ácido araquidónico, acetato de DL-alfa-tocoferol, alcohol etílico, ácido mirístico, ácido oleico, ácido palmitoleico, plurónico F-68, ácido esteárico y Tween 80 son conocidos en la técnica y se puede comprar a proveedores comerciales. Un ejemplo no limitante de una mezcla de lípidos disponible  
55 comercialmente, que es apropiada para la presente invención es el concentrado de lípidos químicamente definido de Gibco (número de catálogo 11905-031, cantidad: 100 ml), que se caracteriza porque contiene 2,0 mg/L de ácido araquidónico, 220 mg/L de colesterol, 70 mg/L de acetato de DL-alfa-tocoferol, niveles confidenciales de alcohol etílico al 100%, 10 mg/L de ácido linoleico, 10 mg/L de ácido linolénico, 10 mg/L de ácido mirístico, 10 mg/L de ácido oleico, 10 mg/L de ácido palmítico, 10 mg/L de ácido palmitoleico, 90000 mg/L de plurónico F-68, 10 mg/L de ácido esteárico, 2200 mg/L de Tween 80®). Además, otras mezclas de lípidos que comprenden una composición diferente de lípidos y derivados de los mismos, presentes en concentraciones similares o diferentes, también se pueden usar en el medio de cultivo de la presente invención, pero sería

preferible usar las mezclas de lípidos que se enseña en la presente memoria. La persona experta sabe cómo preparar mezclas de lípidos alternativos, sabe cómo seleccionar lípidos individuales y derivados de los mismos, y sabe cómo seleccionar las dosis eficaces apropiadas, de modo que se conserve la eficacia como se divulga en la presente memoria del medio de cultivo según la presente invención.

5 En la preparación de las composiciones del medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria, podría ser particularmente ventajoso agregar carnitina a la composición del medio de cultivo. Sin limitarse a ninguna teoría, el presente inventor descubrió que la carnitina es ventajosa para promover vías bioenergéticas (por ejemplo, actividad mitocondrial) durante la diferenciación y maduración de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PSC y/o iPSC en cultivo *in vitro*.

10 En una realización, la composición del medio de cultivo de la invención puede comprender aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 3,5 mM de carnitina.

En otra realización, la composición de cultivo de la invención puede comprender aproximadamente de 0,01 a 5 mM de carnitina, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 4 mM de carnitina, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 3 mM de carnitina, preferiblemente de aproximadamente 1,0 a 2,5 mM de carnitina, más preferiblemente de aproximadamente 1,5 a 2,25 mM de carnitina.

15 En una realización, la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria puede comprender además un compuesto de creatina y un compuesto de taurina.

Sin estar ligado a ninguna teoría, el presente inventor descubrió que puede ser ventajoso agregar creatina a las composiciones de medio de cultivo de la invención para prevenir o aliviar la muerte celular, y taurina para prevenir o aliviar la necrosis celular inducida por isquemia y apoptosis en cultivo *in vitro*. El presente inventor también observó que la presencia de T3, carnitina, creatina y taurina en la composición del medio de cultivo de la invención representa una combinación poderosa en el sentido de que la presencia de dicha combinación en las composiciones del medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria mejora la maduración de los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* mientras que al mismo tiempo promueven su supervivencia en cultivo *in vitro*. Este efecto también está asociado con un aumento en el rendimiento (mayor número) de cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto obtenidos a partir de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* por los procedimientos que se enseñan en la presente memoria.

20 En una realización, la composición del medio de cultivo de la invención puede comprender aproximadamente 3,0 mM a aproximadamente 7,0 mM de creatina.

En una realización, la composición del medio de cultivo de la invención puede comprender aproximadamente 2,0 mM a aproximadamente 7,0 mM de taurina.

En una realización, la composición del medio de cultivo de la invención puede comprender aproximadamente 1 a 10 mM de creatina, preferiblemente aproximadamente 2 a 8 mM de creatina, preferiblemente aproximadamente 3 a 7 mM de creatina, preferiblemente aproximadamente 3,5 a 6,0 mM de creatina, más preferiblemente de aproximadamente 4,5 a 5,5 mM de creatina.

35 En una realización, la composición del medio de cultivo de la invención puede comprender de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 25 mM de taurina, preferiblemente de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 20 mM de taurina, preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 15 mM de taurina, preferiblemente de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 10 mM de taurina, preferiblemente de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7 mM de taurina, más preferiblemente de aproximadamente 5 mM de taurina.

Por ejemplo, los ejemplos no limitantes de concentración de taurina que se pueden usar en la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria y/o en el procedimiento que se enseña en la presente memoria y/o en el kit que se enseña en la presente memoria pueden incluir aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mM de taurina, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 4 mM de taurina, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3 mM de taurina, preferiblemente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,5 mM de taurina, más preferiblemente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,25 mM de taurina.

En una realización preferida, la composición del medio de cultivo de la invención puede comprender de aproximadamente 0,01 a 5 mM de carnitina, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 4 mM de carnitina, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 3 mM de carnitina, preferiblemente de aproximadamente 1,0 a 2,5 mM de carnitina, más preferiblemente de aproximadamente 1,5 a 2,25 mM de carnitina, y de aproximadamente 1 a 10 mM de creatina, preferiblemente de aproximadamente 2 a 8 mM de creatina, preferiblemente de aproximadamente 3 a 7 mM de creatina, preferiblemente de aproximadamente 3,5 a 6,0 mM de creatina, más preferiblemente de aproximadamente 4,5 a 5,5 mM de creatina, y aproximadamente 1,0 a 25 mM de taurina, preferiblemente de aproximadamente 2,0 a 20 mM de taurina, preferiblemente de aproximadamente 3 a 15 mM

de taurina, preferiblemente de aproximadamente 4,0 a 10 mM de taurina, preferiblemente de aproximadamente 4,5 a 7 mM de taurina, más preferiblemente aproximadamente 5 mM de taurina.

5 En una realización preferida de la invención, se encontró que se obtuvieron resultados óptimos cuando las composiciones de medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria comprenden aproximadamente 2 mM de carnitina, aproximadamente 5 mM de creatina y aproximadamente 5 mM de taurina también se observó que la L-carnitina fue particularmente apropiada para la preparación de la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria.

10 En una realización, el medio de cultivo de la invención puede comprender además de aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 50 mg/L de insulina, preferiblemente de aproximadamente 3 mg/L a aproximadamente 40 mg/L de insulina, preferiblemente de aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 30 mg/L de insulina, preferiblemente de aproximadamente 7 mg/L a aproximadamente 20 mg/L de insulina, preferiblemente de aproximadamente 9 mg/L a aproximadamente 12 mg/L de insulina, preferiblemente de aproximadamente 9,5 mg/L a aproximadamente 10,5 mg/L de insulina, más preferiblemente aproximadamente 10 mg/L de insulina.

15 En otra realización, el medio de cultivo de la invención puede comprender además de aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 25 mg/L de transferrina, preferiblemente de aproximadamente 1,5 mg/L a aproximadamente 20 mg/L de transferrina, preferiblemente de aproximadamente 2 mg/L a aproximadamente 15 mg/L de transferrina, preferiblemente de aproximadamente 2,5 mg/L a aproximadamente 10 mg/L de transferrina, preferiblemente de aproximadamente 3 mg/L a aproximadamente 8 mg/L de transferrina, preferiblemente de aproximadamente 3,5 mg/L a aproximadamente 7 mg/L de transferrina, preferiblemente de aproximadamente 4 mg/L a aproximadamente 6 mg/L de transferrina, preferiblemente de aproximadamente 4,5 mg/L a aproximadamente 5,7 mg/L de transferrina, más preferiblemente 5,5 mg/L de transferrina.

25 En otra realización, el medio de cultivo de la invención puede comprender además de aproximadamente 0,001 mg/L a aproximadamente 0,01 mg/L de selenio (o selenito de sodio), preferiblemente de aproximadamente 0,002 mg/L a aproximadamente 0,009 mg/L de selenio (o selenito de sodio), preferiblemente de aproximadamente 0,003 mg/L a aproximadamente 0,008 mg/L de selenio (o selenito de sodio), preferiblemente de aproximadamente 0,004 mg/L a aproximadamente 0,0075 mg/L de selenio (o selenito de sodio), preferiblemente de aproximadamente 0,005 mg/L a aproximadamente 0,007 mg/L de selenio (o selenito de sodio), preferiblemente de aproximadamente 0,006 mg/L a aproximadamente 0,0069 mg/L de selenio (o selenito de sodio), preferiblemente de aproximadamente 0,0065 mg/L a aproximadamente 0,0068 mg/L de selenio (o selenito de sodio), más preferiblemente de aproximadamente 0,0067 mg/L de selenio (o selenito de sodio).

En una realización preferida, el medio de cultivo de la invención puede comprender además de aproximadamente 5 mg/L a aproximadamente 15 mg/L de insulina, y aproximadamente 3 mg/L a aproximadamente 8 mg/L de transferrina, y aproximadamente 0,005 mg/L a aproximadamente 0,0075 mg/L de selenio (o selenito de sodio).

35 En una realización preferida, las composiciones de medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria pueden comprender aproximadamente 10 mg/L de insulina, aproximadamente 5,5 mg/L de transferrina y aproximadamente 0,0067 mg/L de selenio (o selenito de sodio).

40 La insulina, la transferencia y el selenio son bien conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Un ejemplo no limitante de preparación disponible comercialmente que comprende insulina, transferrina y selenio es la preparación de solución de etanolamina de insulina-transferrina-selenio (ITS-X) de Gibco (número de catálogo 51500, cantidad: 10 mL), que se caracteriza porque contiene 1000 mg/L (0,17 mM) de insulina, 550 mg/L (6,87 mM) de transferrina, 0,67 mg/L (0,0038 mM) de selenito de sodio, 200 mg/ml (3,27 mM) de etanolamina.

45 En una realización, las composiciones de medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria pueden comprender además uno o más oligoelementos. El presente inventor descubrió que la presencia de uno o más oligoelementos en el medio de cultivo es particularmente ventajosa para promover la maduración de cardiomocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* en comparación con una situación en la que las composiciones de medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria carecen de uno o más oligoelementos. También se descubrió que la presencia de uno o más oligoelementos es ventajosa para mantener cardiomocitos (maduros) de tipo adulto generados a partir de cardiomocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o cardiomocitos tipo fetal (inmaduros) derivados de iPSC en cultivos *in vitro* durante un período prolongado de tiempo, por ejemplo, hasta varios meses en comparación con una situación en la que las composiciones de medio de cultivo tal como se enseñan en la presente memoria carecen de uno o más oligoelementos. El inventor también descubrió que la adición de uno o más oligoelementos era beneficiosa para aumentar el rendimiento (cantidad) y la calidad de los cardiomocitos (maduros) de tipo adulto obtenidos de los cardiomocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o cardiomocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de iPSC en cultivo *in vitro* en comparación con una situación en la que las composiciones de medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria carecen de uno o más oligoelementos. Sin estar vinculado a ninguna teoría, la presencia de uno o más oligoelementos proporciona actividad antioxidante entre otras acciones biológicas beneficiosas. El uno o más oligoelementos está/están preferiblemente presentes como iones

o complejos quelados. Los iones pueden ser iones simples que comprenden un solo elemento o pueden ser iones complejos que comprenden dos o más elementos. Los iones pueden ser iones simples que comprenden un solo elemento o pueden ser iones complejos que comprenden dos o más elementos. Preferiblemente, los elementos pueden ser elementos de metal de transición, por ejemplo, elementos seleccionados del grupo que consiste en Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Se, Br, Al, Si, P, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Rb, Ce, Ag, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Sb, F, Te, Au, Pt, Bi, Ir, Os, Re, W, Ta y Hf.

En una realización, la composición del medio de cultivo de la invención puede comprender uno o más oligoelementos, preferiblemente todos, seleccionados del grupo de Mn, Si, Mb, V, Ni, Sn, AL, Ag, Ba, K, Cd, Co, CR, F, Ge, I, Rb, y Zr.

En otra realización, el uno o más oligoelementos se pueden seleccionar de  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ,  $Na_2SiO_3 \cdot 9 H_2O$ , sal de amonio del ácido molibdicico ( $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ ),  $NH_4VO_3$ ,  $NiSO_4 \cdot 6 H_2O$ ,  $SnCl_2$  (anhidro),  $AlCl_3 \cdot 6 H_2O$ ,  $AgNO_3$ ,  $Ba(C_2H_3O_2)_2$ ,  $KBr$ ,  $CdCl_2$ ,  $CoCl_2 \cdot 6 H_2O$ ,  $CrCl_3$  (anhidro),  $NaF$ ,  $GeO_2$ ,  $KI$ ,  $RbCl$ , y  $ZrOCl_2 \cdot 8 H_2O$ .

En la realización preferida, la composición del medio de cultivo de la invención puede comprender  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ,  $Na_2SiO_3 \cdot 9 H_2O$ , sal de amonio del ácido molibdicico ( $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ ),  $NH_4VO_3$ ,  $NiSO_4 \cdot 6 H_2O$ ,  $SnCl_2$  (anhidro),  $AlCl_3 \cdot 6 H_2O$ ,  $AgNO_3$ ,  $Ba(C_2H_3O_2)_2$ ,  $KBr$ ,  $CdCl_2$ ,  $CoCl_2 \cdot 6 H_2O$ ,  $CrCl_3$  (anhidro),  $NaF$ ,  $GeO_2$ ,  $KI$ ,  $RbCl$ , y  $ZrOCl_2 \cdot 8 H_2O$ .

Las formulaciones de oligoelementos apropiadas para la preparación del medio de cultivo como si fueran conocidas en la técnica y estén disponibles comercialmente. Por ejemplo, la formulación B de oligoelementos comercialmente disponible (cat. No 25-02 de Corning) y la formulación C de oligoelementos (cat. No 25-023 de Corning) se pueden usar en la presente invención. El presente inventor descubrió que para obtener resultados óptimos, es preferible mezclar la formulación C con la formulación B en una proporción de aproximadamente entre 30:1 y 1:30, preferiblemente 5:1 - 20:1. Más preferiblemente 10:1 (esto es, 10 veces más formulación C que formulación B). La persona experta sabe cómo preparar la mezcla de oligoelementos y cómo seleccionar una proporción eficaz. Por ejemplo, se puede obtener una mezcla de oligoelementos resultante de mezclar la formulación C con la formulación B en una proporción de 10:1 (esto es, 10 veces más formulación C que formulación B) agregando aproximadamente 0,05 ml a 5 ml de formulación B en 10 000 ml de medio de cultivo, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 4 ml de formulación B en 10 000 ml de medio de cultivo, preferiblemente de aproximadamente 0,5 ml a 3 ml de formulación B en 10 000 ml de medio de cultivo, preferiblemente de 0,75 ml a 2 ml de formulación B en 10 000 ml de medio de cultivo, más preferiblemente aproximadamente 1 ml de formulación B en 10 000 ml de medio de cultivo, así como agregando aproximadamente 0,05 ml a 5 ml de formulación C en 1000 ml de medio de cultivo, preferiblemente aproximadamente 0,01 a 4 ml de formulación C en 1000 ml de medio de cultivo, preferiblemente de aproximadamente 0,5 ml a 3 ml de formulación C en 1000 ml de medio de cultivo, preferiblemente de 0,75 ml a 2 ml de formulación C en 1000 ml de medio de cultivo, más preferiblemente de aproximadamente 1 ml de formulación C en 1000 ml de medio de cultivo, en una proporción como, por ejemplo, dado anteriormente, por ejemplo, una proporción de C a B de 10:1. Otras mezclas equivalentes de oligoelementos resultantes de mezclar otras formulaciones de oligoelementos o resultantes del uso de formulaciones o mezclas caseras también se pueden usar para la preparación de la composición del medio de cultivo según la presente invención, pero el (los) oligoelemento(s) y la mezcla de oligoelementos que se enseña en la presente memoria son preferidos.

En una realización, las composiciones de medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria pueden comprender además alcohol polivinílico (PVA). Sin estar vinculado a ninguna teoría, el presente inventor ha descubierto que la presencia de PVA en la composición del medio de cultivo de la invención es particularmente ventajosa para promover la formación y el mantenimiento de una disposición tridimensional entre cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* en comparación con una situación en la que las composiciones de medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria carecen de PVA. También se observaron las mismas ventajas para los cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto generados a partir de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro*.

El PVA es bien conocido en la técnica y se puede comprar comercialmente. Los análogos o derivados de PVA también se pueden usar para la preparación del medio de cultivo según la presente invención, pero se prefiere PVA como se divulga en la presente memoria. La persona experta sabe cómo preparar y disolver PVA para obtener una forma líquida de PVA apropiada.

En una realización, el medio de cultivo de la invención puede comprender además de 2 mg/ml a aproximadamente 7 mg/ml de PVA.

En una realización de la invención, la composición del medio de cultivo puede comprender de aproximadamente 0,1 a 10 mg/ml de PVA, preferiblemente de aproximadamente 3 a 8 mg/ml de PVA, más preferiblemente de aproximadamente 4 a 6 mg/ml de PVA.

En una realización preferida, la composición del medio de cultivo puede comprender al menos aproximadamente 1,25 mg/ml de PVA, preferiblemente aproximadamente 5 mg/ml de PVA.

- En una realización, el medio de cultivo de la invención puede comprender además comprende uno o más compuestos seleccionados del grupo de aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, constituyentes orgánicos, sales inorgánicas, albúmina de suero bovino altamente purificado, suplemento de crecimiento (por ejemplo, mezcla de nutrientes Ham's F12), antioxidantes, antibióticos, monoioliglicerol, glutamina y glucosa. La composición del medio de cultivo también puede comprender además una solución salina fisiológicamente aceptable, preferiblemente una solución salina isotónica.
- 5 En una realización preferida, la composición del medio de cultivo de la invención puede comprender además albúmina de suero bovino, glucosa, vitaminas, antibióticos, monoioliglicerol, glutamina, aminoácidos y la mezcla de nutrientes F12 de Ham.
- 10 El presente inventor ha descubierto que puede ser ventajoso usar un medio de cultivo libre de suero que tenga un contenido de glucosa más bajo en relación con los medios de cultivo libre de suero estándar, para la preparación del medio de cultivo de la invención. Por ejemplo, los medios estándar libre de suero contienen aproximadamente 3000 mg/L de glucosa (17,5 mM). El medio de cultivo libre de suero bajo en glucosa disponible comercialmente contiene aproximadamente 1000 mg/L de glucosa (5,5 mM).
- 15 En una realización, tal formulación de medio de cultivo libre de suero bajo en glucosa se puede usar para la preparación de la composición de medio de cultivo de la invención. Se puede usar una dilución de un medio de cultivo libre de suero bajo en glucosa disponible comercialmente o cualquier otra formulación casera en la preparación de la composición del medio de cultivo según la presente invención.
- 20 En una realización, las composiciones de medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria pueden comprender aproximadamente 1 a 10 mM de glucosa, preferiblemente aproximadamente 2 a 8 mM de glucosa, de preferiblemente 3 a 7 mM de glucosa, de preferiblemente 4,5 a 6,5 mM de glucosa, más preferiblemente de aproximadamente 5,0 a 6,0 mM de glucosa.
- En una realización preferida, la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria puede comprender al menos aproximadamente 1 mM de glucosa y no más de aproximadamente 5,5 mM de glucosa.
- 25 En una realización adicional, la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria puede comprender aproximadamente 10 a 200 microM de glucosa, preferiblemente aproximadamente 25 a 150 microM de glucosa, más preferiblemente aproximadamente 45 a 120 microM de glucosa. Preferiblemente, la composición del medio de cultivo puede comprender al menos aproximadamente 55 microM de glucosa y no más de aproximadamente 111 microM de glucosa.
- 30 En una realización, la composición del medio de cultivo de la invención puede estar libre de glucosa. En otra realización más, la glucosa es D-glucosa.
- En una realización, la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria puede estar en forma líquida, en forma semilíquida o en forma sólida o en forma semisólida. En una realización preferida, la composición del medio de cultivo de la invención está en una forma líquida.
- 35 En una realización, la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria puede ser una composición sólida, preferiblemente una composición en polvo, en la que la composición se puede disolver en una solución acuosa para obtener las composiciones que se enseñan en la presente memoria.
- Los ejemplos no limitantes de formas sólidas incluyen polvo, gránulo, cristal, comprimido, pasta, puré, mezcla húmeda, pellas, forma liofilizada, forma deshidratada por congelación y similares.
- 40 En una realización preferida, la forma sólida es un polvo.
- Las composiciones de medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria también se pueden denominar "composiciones de medio de maduración".
- 45 La composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria puede carecer de un compuesto similar a la hormona tiroidea. En otras palabras, el mismo medio, que tiene la (s) composición (es) idéntica (s) como se detalla anteriormente, pero sin la adición o presencia de ningún compuesto similar a la hormona tiroidea, se puede usar en la maduración de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* usando los procedimientos o kits como se divulga en la presente memoria.
- 50 El presente inventor descubrió que este medio de composición de cultivo alternativo de la invención (esto es, sin el compuesto similar a la hormona tiroidea) se puede usar para madurar cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro*, como se puede ver en los ejemplos. Sin embargo, el presente inventor observó que los efectos de la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria, pero que carece de un compuesto similar a la hormona tiroidea, en la maduración de los cardiomiocitos de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro*, son menos pronunciados (menos eficientes, menos robustos) que lo que se puede lograr (que se enseña en la presente memoria) con la composición del medio de

cultivo de la invención, pero que comprende al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea. Este medio alternativo, esto es, que tiene las composiciones idénticas a las detalladas anteriormente, pero sin la presencia de ningún compuesto similar a la hormona tiroidea, se puede usar solo o en combinación con el medio divulgado en la presente memoria, pero que comprende al menos el compuesto similar a la hormona tiroidea. Por ejemplo, y en una realización preferida, los cardiomiocitos de tipo fetal se pueden exponer primero a un medio de cultivo como se divulga en la presente memoria, pero sin ningún compuesto similar a la hormona tiroidea, seguido de reemplazo del medio, por ejemplo después de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días de incubación, con el medio como se divulga en la presente memoria pero que comprende al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea para la maduración de cardiomiocitos de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro*.

10 **Procedimientos de la invención.**

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de generación de cardiomiocitos de tipo adulto a partir de PESC y/o iPSC, en particular de cardiomiocitos de tipo fetal diferenciados de dichas PESC y/o iPSC, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar el uno o más cardiomiocitos de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC;

15 - (b) poner en contacto dichos cardiomiocitos de tipo fetal con la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria para permitir la maduración de dichos cardiomiocitos de tipo fetal en cardiomiocitos de tipo adulto.

20 En la etapa (a), los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal se pueden obtener de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* o se pueden obtener de otras fuentes tales como líneas celulares disponibles comercialmente. La persona experta sabe cómo obtener y cómo cultivar dichos cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal para que sean apropiados para su uso en el procedimiento de la invención.

En una realización, los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal pueden ser de origen mamífero, por ejemplo de un ratón, rata, caballo, perro, vaca o primate no humano y similares.

25 En una realización preferida, los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal pueden ser de origen humano, por ejemplo, tal como se obtienen mediante técnicas como la técnica descrita en Chung (Chung et al (2008) Cell Stem Cell, Vol 2(2):113-117).

En la etapa (b), el término "poner en contacto" como se usa en la presente memoria se refiere a una interacción directa entre las composiciones del medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria y las células (por ejemplo, cardiomiocitos) o un cultivo celular (por ejemplo, cultivo de cardiomiocitos).

30 En una realización, los cardiomiocitos de tipo fetal de la etapa (b) están en contacto con la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria durante al menos aproximadamente 1 día hasta aproximadamente 4 semanas.

35 En una realización, los cardiomiocitos de tipo fetal de la etapa (b) están en contacto con la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria durante al menos aproximadamente 1 día, preferiblemente aproximadamente 2 días, preferiblemente aproximadamente 3 días, preferiblemente aproximadamente 4 días, preferiblemente aproximadamente 5 días, preferiblemente aproximadamente 6 días, preferiblemente aproximadamente 7 días, preferiblemente aproximadamente 8 días, preferiblemente aproximadamente 9 días, preferiblemente aproximadamente 10 días, preferiblemente aproximadamente 11 días, preferiblemente aproximadamente 12 días, preferiblemente aproximadamente 13 días, preferiblemente aproximadamente 14 días, más preferiblemente aproximadamente 15 días.

En una realización, los cardiomiocitos de tipo fetal de la etapa (b) están en contacto con la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria durante al menos aproximadamente 3 días hasta aproximadamente 15 días.

45 En una realización preferida, los cardiomiocitos de tipo fetal de la etapa (b) están en contacto con la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria durante aproximadamente 15 días.

50 En una realización, los cardiomiocitos de tipo fetal de la etapa (b) están primero en contacto con la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria pero que carece de un compuesto similar a la hormona tiroidea durante un período de, por ejemplo, entre 1 y 10 días, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, antes de estar en contacto con la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria y que comprende al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea. Por ejemplo, los cardiomiocitos de tipo fetal de la etapa (b) se pueden incubar en la composición del medio de cultivo como se indica, pero sin ningún tipo de hormona tiroidea durante un período de 2 días, seguido de la sustitución de la composición del medio de cultivo por una composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria pero que comprende al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea (por ejemplo, T3), y permite que dichos cardiomiocitos de tipo fetal  
55 entren en contacto con la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria pero que

- comprende al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea para el recordatorio del tratamiento, por ejemplo, del día 3 al día 4, o del día 3 al día 5, o del día 3 al día 6, o del día 3 al día 7, o del día 3 al día 8, o del día 3 al día 9, o del día 3 al día 10, o del día 3 al día 11, o del día 3 al día 12, o del día 3 al día 13, o del día 3 al día 14 o del día 3 al día 15. En otras palabras, se puede comenzar el procedimiento de maduración usando el procedimiento que se enseña en la presente memoria usando una composición de medio de cultivo desprovista de cualquier compuesto similar a la hormona tiroidea mientras se continúa después con una composición de medio de cultivo que se enseña en la presente memoria que comprende al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea.
- El presente inventor descubrió que puede ser ventajoso poner en contacto primero los cardiomiocitos de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* con la composición del medio de cultivo de la invención que se enseña en la presente memoria pero que carece del compuesto similar de la hormona tiroidea antes del contacto con la composición del medio de cultivo de la invención que se enseña en la presente memoria pero que comprende al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea para mejorar o facilitar la formación de una monocapa de cardiomiocitos en cultivo *in vitro*.
- En otra realización, los cardiomiocitos de tipo fetal que se obtuvieron mediante la diferenciación (no diferenciada) de PESC y/o iPSC en los cardiomiocitos se cultivan en condiciones de cantidades crecientes del compuesto similar a la hormona tiroidea, por ejemplo T3. En otras palabras, con el tiempo, aumenta la concentración del compuesto similar a la hormona tiroidea (ya sea por adición al medio o por reemplazo del medio con un medio nuevo como se divulga en la presente memoria, pero con una concentración aumentada de T3 en comparación con el medio anterior). Por ejemplo, los cardiomiocitos de tipo fetal que se obtuvieron mediante la diferenciación (indiferenciada) de PESC y/o iPSC se pueden cultivar primero en el medio como se divulga en la presente memoria, pero que carece de cualquier compuesto similar a la hormona tiroidea, por ejemplo, 1,2, 3 o 4 días (o más). Después de los 1,2,3 o 4 días (o más), el medio se reemplaza por el medio de cultivo de la presente invención con, por ejemplo, 10 ng/ml de T3 y se cultiva por 1,2,3 o 4 días adicionales (o más). A continuación, el medio se reemplaza con medio nuevo según la presente invención y que comprende una concentración incrementada del compuesto similar a la hormona tiroidea, por ejemplo T3. Por ejemplo, la composición del medio de cultivo en la siguiente etapa comprende 50 ng/ml de T3. Si así se desea o se requiere, se pueden aplicar etapas adicionales con la misma concentración de concentraciones más altas del compuesto similar a la hormona tiroidea en el cultivo de las células, durante cualquier cantidad de días deseable.
- En una realización, los cardiomiocitos de tipo fetal de la etapa (b) están en contacto con la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria, en la que la composición del medio de cultivo está a una temperatura de al menos 21 °C hasta una temperatura que es no sustancialmente más alto que 37 °C.
- En otra realización, los cardiomiocitos de tipo fetal de la etapa (b) están en contacto con la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria, en la que la composición del medio de cultivo está a una temperatura de aproximadamente 30 °C, preferiblemente aproximadamente 31 °C, preferiblemente aproximadamente 32 °C a aproximadamente 33 °C, preferiblemente aproximadamente 34 °C, preferiblemente aproximadamente 35 °C, preferiblemente aproximadamente 36 °C, más preferiblemente aproximadamente 37 °C. En una realización preferida, los cardiomiocitos de tipo fetal de la etapa (b) están en contacto con la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria, en la que la composición del medio de cultivo está a una temperatura de aproximadamente 37 °C.
- En una realización, la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria se repone diariamente durante la duración del tratamiento que se enseña en la presente memoria.
- En una realización preferida, la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria se repone cada 2 días o 3 días durante la duración del tratamiento que se enseña en la presente memoria.
- En una realización, la composición del medio de cultivo de la etapa (b) está en forma sólida, preferiblemente en forma de polvo, que puede disolverse en una solución acuosa para obtener el medio de cultivo líquido de las etapas (b).
- En una realización, la madurez de los cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto generados a partir de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* se puede determinar evaluando las características morfológicas de dichos cardiomiocitos de tipo adulto y comparando los resultados con los de cardiomiocitos de tipo adulto obtenidos de un sujeto adulto (u otras fuentes, por ejemplo, líneas celulares), así como con los de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro*, que fueron expuestos a la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria, que carece del al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea. Los procedimientos para evaluar las características morfológicas (por ejemplo, forma) y/o características histológicas (por ejemplo, presencia de ciertas estructuras o componentes celulares, organización del citoesqueleto, etc.) de las células (por ejemplo, cardiomiocitos) para obtener información sobre la morfología y la apariencia de una célula dada es bien conocida en la técnica. Por ejemplo, en la presente invención, se pueden usar técnicas de inmunohistoquímica para detectar o revelar marcadores celulares particulares o marcadores del citoesqueleto de células cardíacas. Un

ejemplo representativo no limitante de dicho marcador es la alfa-actinina. Otros ejemplos no limitantes de marcadores incluyen troponina C, troponina I, troponina T, cadena pesada de miosina 6, cadena pesada de miosina 7, mybpc3, cadena ligera de miosina, tropomiosina, titina, miomesina y similares.

5 El presente inventor descubrió que los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal expuestos a la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria, que comprende al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea, maduraron en cardiomiocitos de tipo adulto, como lo demuestran los cambios en sus características morfológicas que recordaban una etapa adulta (o de tipo adulto), tal como la polarización de las células, una mejor organización sarcomérica y una forma alargada. Tales cambios en las características morfológicas se observaron menos en los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal que no estuvieron expuestos a al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea durante el procedimiento de maduración en cultivo *in vitro*.

10 En otra realización, la madurez de los cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto generados a partir de los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* mediante el procedimiento que se enseña en la presente memoria se puede determinar evaluando las propiedades funcionales de dichos cardiomiocitos de tipo adulto y comparando los resultados con los de cardiomiocitos de adultos obtenidos de un sujeto adulto (u otras fuentes, por ejemplo, línea celular), así como con los de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro*, que se expusieron a la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria, pero que carecían de al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea. Los procedimientos para evaluar las propiedades funcionales de las células (por ejemplo, cardiomiocitos) para obtener información sobre el fenotipo funcional de una célula dada son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en la presente invención, las técnicas de electrofisiología (entre otras técnicas) se pueden usar para detectar o revelar funciones particulares o fenotipos funcionales de una célula (por ejemplo, cardiomiocitos). Un ejemplo no limitante de tal técnica de electrofisiología es la técnica llamada "patch-clamp".

15 La técnica patch-clamp es una técnica de laboratorio bien conocida que permite el estudio de canales iónicos únicos o múltiples en las células. La técnica se puede aplicar a una amplia variedad de células, pero es especialmente útil en el estudio de células excitables tales como neuronas, cardiomiocitos, fibras musculares y células beta pancreáticas. En la presente invención, tal técnica se puede usar para estudiar las propiedades del llamado "potencial de acción", que sirve como una indicación de la capacidad de una célula (por ejemplo, cardiomiocitos) para transmitir un impulso eléctrico de una célula a otra. Por ejemplo, se puede obtener información sobre la velocidad máxima de despolarización, la duración del potencial de acción, el potencial de membrana en reposo y la amplitud del potencial de acción mediante el uso de la técnica patch-clamp.

20 El presente inventor descubrió que los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal expuestos a la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria, que comprende al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea, maduraron en cardiomiocitos de tipo adulto, como lo demuestran los cambios en sus características electrofisiológicas que recordaban una etapa adulta (o de tipo adulto), tal como un aumento de la velocidad máxima de despolarización, un potencial de membrana en reposo más bajo y una mayor amplitud del potencial de acción. Tales cambios en las propiedades electrofisiológicas se observaron menos en los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal que no estuvieron expuestos a al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea durante el procedimiento de maduración en cultivo *in vitro*.

25 En una realización adicional, la madurez de los cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto generados a partir de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* se puede determinar evaluando el perfil metabólico de dichos cardiomiocitos de tipo adulto y comparando los resultados con los de cardiomiocitos de tipo adulto obtenidos de un sujeto adulto (u otras fuentes, por ejemplo, línea celular) así como con los de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro*, que fueron expuesto a la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria pero que carecía de al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea. Los procedimientos para evaluar el perfil metabólico de las células (por ejemplo, cardiomiocitos) para obtener información sobre la eficiencia y la madurez de las funciones metabólicas o las vías de una célula dada son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en la presente invención, se puede usar un denominado "ensayo TMRM" para detectar o revelar el nivel de actividad mitocondrial en una célula dada (por ejemplo, cardiomiocitos). La persona experta está familiarizada con el ensayo TMRM y sabe cómo llevar a cabo dicho ensayo para obtener información sobre el nivel de actividad mitocondrial de los cardiomiocitos en el cultivo *in vitro*.

30 El presente inventor descubrió que los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal expuestos a la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria, que comprende al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea, maduraron en cardiomiocitos de tipo adulto, como lo demuestran los cambios en su perfil metabólico que recordaban una etapa adulta (o de tipo adulto), tal como el aumento de la actividad mitocondrial. Tales cambios en el perfil metabólico se observaron en menor medida en los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal que no estuvieron expuestos a al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea durante el procedimiento de maduración en cultivo *in vitro*.

35 En otra realización más, la madurez de los cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto generados a partir de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* se puede determinar

5 evaluando el perfil de expresión génica de dichos cardiomiocitos de tipo adulto y comparando los resultados con los de cardiomiocitos adultos obtenidos de un sujeto adulto (u otras fuentes, por ejemplo, línea celular) así como con los de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro*, que se expusieron a la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria pero que carecían de al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea. Los procedimientos para evaluar el perfil de expresión génica de las células (por ejemplo, cardiomiocitos) a fin de obtener información sobre la presencia (ausencia) de un marcador o marcadores de genes dados, así como para obtener información sobre los niveles de expresión de un marcador o marcadores de genes dados para una célula dada (por ejemplo, cardiomiocitos) son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en la presente invención, las técnicas de hibridación *in situ* y/o los llamados ensayos de "chip genético" se pueden usar para detectar y/o medir niveles de expresión de marcadores genéticos específicos para ciertas etapas de desarrollo (por ejemplo, etapas fetales y adultas). Por ejemplo, en la presente invención, los marcadores genéticos indicativos de una etapa adulta o de tipo adulto se pueden usar para establecer si un cardiomiocito de tipo fetal (inmaduro) derivado de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* y expuesto a la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria que comprende al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea ha madurado en un cardiomiocito de tipo adulto (maduro). Los ejemplos no limitantes de marcadores genéticos indicativos de una etapa adulta (o de tipo adulto) incluyen la cadena ligera de miosina 2V, el receptor de calsequestrina y rianodina y otros. El aumento de la expresión (gen) de uno o más de dichos marcadores de tipo adulto (maduro) sería indicativo de un estado de tipo adulto (maduro).

20 Los marcadores genéticos indicativos de una etapa de tipo fetal (inmadura) también se pueden usar para establecer si un cardiomiocito (inmaduro) de tipo fetal derivado de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* ha madurado (o no) en un (cardiomiocitos maduros) de tipo adulto. Por lo general, los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivos *in vitro* expuestos a la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria pero que carece de al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea expresarían marcadores genéticos indicativos de una etapa de tipo fetal (inmaduro). Los ejemplos no limitantes de marcadores genéticos indicativos de una etapa de tipo fetal (inmadura) incluyen NPPA, NPPB, actina de músculo liso y actina esquelética. La disminución de la expresión (génica) de uno o más de dichos marcadores fetales (inmaduros) sería indicativo de un estado de tipo adulto (maduro).

30 En una realización, PESC y/o iPSC indiferenciadas se pueden usar como material de partida para la generación de cardiomiocitos de tipo adulto antes de la etapa (a) del procedimiento que se enseña en la presente memoria para obtener una cantidad apropiada de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal, que son apropiados para usar en el procedimiento de la invención.

35 Se pueden obtener cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal a partir de PESC y/o iPSC indiferenciadas exponiendo dichas PESC y/o iPSC indiferenciadas a una composición de medio de diferenciación apropiada para diferenciar PESC y/o iPSC indiferenciadas en cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal. La persona experta conoce bien los procedimientos y las composiciones de medios de cultivo apropiados para diferenciar PESC y/o iPSC indiferenciadas en cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal en cultivo *in vitro*. Por ejemplo, en la presente invención, una composición de medio de diferenciación básica apropiada para diferenciar PESC y/o iPSC indiferenciadas en cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal es una composición de medio libre de suero, que comprende albúmina (recombinante) y ácido ascórbico, y puede comprender además una mezcla de lípidos, insulina, transferrina y selenio, y uno o más oligoelementos.

40 En otra realización, la composición del medio de diferenciación básica que se enseña en la presente memoria puede comprender además aminoácidos, albúmina sérica bovina, glucosa, vitaminas, antibióticos, monolioliglicerol, glutamina y factores de crecimiento o moléculas pequeñas (por ejemplo, proteína morfogénica ósea 4 (BMP4), activina A (ACT-A), factor de células madre (SCF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)), Chir99021 (inhibidor beta GSK3)) y otros componentes. La persona experta sabe qué ingredientes o sustancias (así como a qué dosis) agregar al medio de cultivo de diferenciación básico que se enseña en la presente memoria, de modo que sea apropiado para diferenciar PESC y/o iPSC indiferenciadas en cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal, que a su vez son apropiados para su uso en el procedimiento de la invención.

45 El presente inventor observó que la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria, pero que carece de un compuesto similar a la hormona tiroidea, también conduce al desarrollo de varias características de tipo adulto como se describió anteriormente, pero en menor medida (menos eficiente, menos robusto) que lo que se puede lograr usando la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria pero que comprende al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea.

50 En una realización, las PESC y/o iPSC indiferenciadas se pueden obtener de fuentes disponibles comercialmente, tales como líneas celulares establecidas, por ejemplo. La persona experta sabe cómo obtener así como cómo cultivar dichas PESC y/o iPSC indiferenciadas para que sean apropiadas para su uso en el procedimiento de la invención.

En una realización, las PESC y/o iPSC indiferenciadas pueden ser de origen mamífero, por ejemplo de un ratón, rata, caballo, perro, vaca, primates no humanos y similares.

5 En una realización preferida, las PESC y/o iPSC indiferenciadas pueden ser de origen humano, por ejemplo, tal como se obtiene mediante el procedimiento descrito por Chung (Chung et al (2008) Cell Stem Cell, Vol 2(2):113-117).

En una realización, las PESC y/o iPSC indiferenciadas se pueden diferenciar en cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal, que son apropiados para usar en el procedimiento que se enseña en la presente memoria, usando una técnica en la que el procedimiento de diferenciación se lleva a cabo en rotación cuerpos embrionarios (EB). La persona experta está familiarizada con las técnicas de diferenciación llevadas a cabo en spin EB.

10 En otra realización, las PESC y/o iPSC indiferenciadas se pueden diferenciar en cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal, que son apropiados para usar en el procedimiento que se enseña en la presente memoria, usando una técnica en la que el procedimiento de diferenciación se lleva a cabo en monocapa. La persona experta también está familiarizada con las técnicas de diferenciación realizadas en monocapa.

**Usos apropiados de la composición del medio de cultivo de la invención.**

15 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a los usos apropiados de las composiciones de medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria.

En una realización, las composiciones de medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria son apropiadas para la maduración de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* en cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto en cultivo *in vitro* por el procedimiento de la invención.

20 En una realización, las células PESC y/o iPSC se pueden obtener de origen mamífero, preferiblemente de origen humano. También se pueden usar líneas PESC establecidas de origen mamífero, preferiblemente de origen humano. Por ejemplo, diversas líneas celulares PESC de ratón y líneas PESC humanas son conocidas en la técnica y las condiciones para su crecimiento y propagación han sido bien definidas. La persona experta sabe cómo obtener líneas PESC apropiadas (de humanos u otros mamíferos), por ejemplo, mediante un  
25 procedimiento como el descrito por Chung (Chung et al (2008) Cell Stem Cell, Vol. 2(2): 113-117) o cualquier otro procedimiento similar al de Chung et al (supra).

En otra realización, se usan iPSC. La persona experta sabe cómo obtener y cómo cultivar iPSC para que sean apropiados para su uso en el procedimiento de la invención.

En una realización, el iPSC puede ser de origen mamífero, preferiblemente de origen humano.

30 En una realización, las composiciones de medio de cultivo de la invención se pueden usar para mantener cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto generados a partir de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* durante un período prolongado de tiempo, por ejemplo, durante 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 6 semanas y hasta 6 meses. El presente inventor descubrió que las composiciones del medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria mejoran  
35 la supervivencia (esto es, previenen o alivian la muerte celular) de cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto generados a partir de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro*, por el procedimiento que se enseña en la presente memoria, con el tiempo. Este efecto también se asoció con un aumento del rendimiento (mayor cantidad) de dichos cardiomiocitos de tipo adulto en cultivo *in vitro* por el procedimiento de la invención.

40 En una realización, las composiciones de medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria pueden ser apropiadas para su uso en cultivo celular *in vitro* en general, preferiblemente en un cultivo tridimensional.

En otra realización, las composiciones de medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria se pueden usar para aumentar o aumentar la supervivencia de cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto generados a partir de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal  
45 derivados de iPSC en cultivo *in vitro* mientras que al mismo tiempo promueven la maduración de dichos cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal en cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto. De hecho, el presente inventor descubrió sorprendentemente que las composiciones de medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria no solo promueven y mejoran la maduración de los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* en cardiomiocitos de tipo adulto, sino que también aumentan su  
50 supervivencia en cultivo *in vitro*. También se encontró que este efecto está asociado con un aumento en el rendimiento de cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto en cultivo *in vitro* usando el procedimiento que se enseña en la presente memoria.

En una realización adicional, las composiciones de medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria se pueden usar para transportar cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto generados a partir de cardiomiocitos  
55 (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* mediante el procedimiento de la presente

invención u obtenido de otras fuentes. Por ejemplo, las composiciones de medio de cultivo de la presente invención pueden ser particularmente apropiadas para transportar dichos cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto en recipientes tales como tubos, placas de Petri, eppendorfs, matraces, botellas y similares.

5 En una realización, los cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto generados a partir de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* por el procedimiento de la presente invención se pueden usar para cribar fármacos cardíacos y otros fármacos *in vitro*, por ejemplo en ensayos de cribado de alto rendimiento.

10 En otra realización, los cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto generados a partir de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* mediante el procedimiento de la presente invención se pueden usar en ensayos de cribado de toxicología predictiva..

En otra realización, los de tipo adulto (maduros) generados a partir de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* por el procedimiento de la presente invención se pueden usar en investigación cardiovascular.

15 En otra realización más, los cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto generados a partir de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro* por el procedimiento de la presente invención se pueden usar para el tratamiento de enfermedades cardíacas u otras enfermedades, así como para el tratamiento del daño del tejido cardíaco o lesiones cardíacas en un sujeto que lo necesite o sujetos que están en riesgo de desarrollar enfermedades o trastornos cardiovasculares y/o sufrir daños o lesiones del tejido cardíaco.

20 En una realización de la invención, el sujeto puede ser un mamífero tal como un primate no humano, perro, gato, vaca, ratón, rata, caballo y similares.

En una realización preferida, el sujeto puede ser un sujeto humano, preferiblemente un sujeto humano adulto.

25 Los ejemplos no limitantes de enfermedades y trastornos cardíacos incluyen, pero no se limitan a, aterosclerosis, accidente cerebrovascular, cardiopatía congénita, insuficiencia cardíaca congestiva, angina, miocarditis, enfermedad de las arterias coronarias, cardiomiopatía, cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía hipertrófica, endocarditis, infarto de miocardio (ataque cardíaco), disfunción diastólica, enfermedad cerebrovascular, enfermedad valvular, presión arterial alta (hipertensión), prolapso de la válvula mitral y tromboembolismo venoso. Los sujetos en riesgo incluyen aquellos con antecedentes familiares (presión arterial alta, enfermedad cardíaca), predisposición genética (hipercolesterolemia) o que hayan sufrido una afección previa con una enfermedad o  
30 trastorno cardíaco. Los sujetos en riesgo incluyen además aquellos con o en riesgo de hipertensión arterial o colesterol alto debido a una predisposición genética o una dieta, tal como un alto contenido de grasa o exposición ambiental, tal como fumadores.

### **Kits de la invención**

35 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un kit apropiado de generación de cardiomiocitos de tipo adulto en cultivo *in vitro* que comprende las composiciones de medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria.

En una realización, el kit que se enseña en la presente memoria puede comprender además un medio de cultivo de composiciones que se enseña en la presente memoria pero desprovisto de cualquier compuesto similar a la hormona tiroidea.

40 En una realización, las composiciones de medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria, que están comprendidas en el kit que se enseña en la presente memoria, pueden proporcionarse en forma líquida.

En otra realización, las composiciones de medio de cultivo que se enseñan en la presente memoria, que están comprendidas en el kit que se enseña en la presente memoria, se pueden proporcionar en forma sólida, preferiblemente en forma de polvo.

45 En una realización adicional, el kit que se enseña en la presente memoria puede comprender además cardiomiocitos de tipo fetal (derivados de PESC y/o iPSC, preferiblemente humanos), esto es, el kit puede comprender la composición del medio de cultivo como se divulga en la presente memoria que comprende al menos uno compuesto similar a la hormona tiroidea junto con cardiomiocitos de tipo fetal (derivados de PESC y/o iPSC) o, por ejemplo, el kit puede comprender la composición del medio de cultivo como se divulga en la  
50 presente memoria que comprende al menos un compuesto similar a la hormona tiroidea junto con cardiomiocitos de tipo fetal (derivados de PESC y/o iPSC) junto con la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria desprovista de cualquier compuesto similar a la hormona tiroidea.

En una realización, los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal se pueden derivar de PESC y/o iPSC y pueden ser de origen mamífero (por ejemplo, ratas, ratones, perros, caballos, vacas y primates no humanos), preferiblemente de origen humano.

5 En una realización, el kit que se enseña en la presente memoria puede comprender además PESC y/o iPSC indiferenciadas.

En una realización, las PESC y/o iPSC indiferenciadas se pueden obtener de origen mamífero (por ejemplo, rata, ratón, perro, caballo, vaca y primate no humano), preferiblemente de origen humano.

10 En otra realización, el kit que se enseña en la presente memoria puede comprender instrucciones sobre cómo generar cardiomiocitos de tipo adulto según el procedimiento de la invención usando cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC y/o iPSC como material de partida.

En otra realización, el kit que se enseña en la presente memoria puede comprender instrucciones sobre cómo generar cardiomiocitos de tipo adulto según el procedimiento de la invención usando PESC indiferenciadas y/o iPSC indiferenciadas como material de partida.

15 Por ejemplo, se pueden proporcionar instrucciones sobre cómo cultivar, gastar o proliferar, diferenciar, madurar, mantener y/o preservar cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto en cultivo *in vitro*, dependiendo de si el material de partida es un cardiomiocito (inmaduro) de tipo fetal derivado de PESC y/o iPSC o una PESC indiferenciada y/o una iPSC indiferenciada.

20 En otra realización más, el kit que se enseña en la presente memoria puede comprender además la composición de medio de diferenciación básica que se enseña en la presente memoria, que se puede usar para diferenciar PESC indiferenciadas y/o iPSC indiferenciadas en cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal en cultivo *in vitro*.

25 En una realización, los componentes del kit que se enseña en la presente memoria se pueden suministrar en material de embalaje apropiado. El término "material de embalaje", como se usa en la presente memoria, se refiere a una estructura física que aloja los componentes del kit. El material de embalaje puede mantener los componentes en condiciones estériles y puede estar hecho de material comúnmente usado para tales fines (por ejemplo, papel, vidrio, plástico, papel de aluminio, ampollas, etc.). Por ejemplo, las composiciones de medio de cultivo tal como se enseñan en la presente memoria se pueden envasar en viales, botellas de plástico o vidrio eppendorfs o cualquier otro portador apropiado comúnmente usado para tales fines.

30 Los cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto que se pueden obtener mediante el procedimiento que se enseña en la presente memoria, o que se pueden obtener de otras fuentes, se pueden empaquetar en una placa de cultivo de tejidos, tubo, matraz, botellas de rodillos o placas (por ejemplo, una placa o plato único de múltiples pocillos tal como una placa o plato de múltiples pocillos 8, 16, 32, 64, 96, 384 y 1536) o cualquier portador apropiado comúnmente usado para tales propósitos, y se incluirá en el kit que se enseña en la presente memoria como tal.

35 En una realización, el kit que se enseña en la presente memoria puede comprender además componentes adicionales tales como composición de medio de crecimiento celular, agentes reguladores, agentes conservantes, agentes estabilizantes de células y similares.

En una realización, cada componente del kit que se enseña en la presente memoria se puede suministrar dentro de un recipiente o dispensador individual o se puede suministrar en una mezcla. Además, en otra realización, todos los diversos recipientes o dispensadores del kit que se enseña en la presente memoria se pueden suministrar dentro de un paquete único o múltiple, dependiendo de los fines comerciales y no comerciales.

40 **Breve descripción de las figuras relacionadas con la invención.**

La **figura 1** muestra los efectos de T3 en la maduración de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de células madre embrionarias pluripotentes humanas (PESC) en cultivo *in vitro*. La madurez de los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC se reveló por sus características morfológicas, que se evaluaron mediante técnicas de inmunohistoquímica (inmunofluorescencia) usando un anticuerpo dirigido contra alfa-actinina. Los paneles A y B muestran las características morfológicas de los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC cultivadas en un medio de diferenciación básico que se enseña en la presente memoria, pero que carece de T3 (situación de control 1). Los paneles C y D muestran las características morfológicas de los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC cultivadas en la composición del medio de cultivo (o composición del medio de maduración) que se enseña en la presente memoria pero que carece de T3 (situación de control 2). Los paneles E y F muestran las características morfológicas de los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC cultivadas en la composición del medio de cultivo de la invención pero que comprenden 100 ng/ml de T3. Los paneles B, D y F representan aumentos de los paneles A, C y E, respectivamente. Los resultados muestran que, en comparación con las situaciones de control 1 y 2 (véanse los paneles A-D), los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC cultivadas en la composición del medio de cultivo de la invención que comprende T3 (véanse los paneles E y F) muestran características morfológicas que recordaban más o eran

más cercanas al fenotipo de cardiomiocito adulto, incluyendo la polarización de las células, la organización sarcomérica mejorada y la forma alargada. Tener en cuenta que en comparación con el control 1 (véanse los paneles A y B), los cardiomiocitos cultivados en la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria pero que carecen de T3 (control 2, véanse los paneles C y D) también mostraron características morfológicas que recordaban un fenotipo de cardiomiocito adulto, pero en menor medida (menos eficiente, menos robusto) que lo observado en presencia de T3 (véanse los paneles E y F).

La **figura 2** representa los efectos de T3 en la maduración de los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de células madre embrionarias pluripotentes humanas (PESC) en cultivo *in vitro*. La madurez de los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC se reveló por sus propiedades electrofisiológicas, que se evaluaron mediante técnicas patch-clamp. Se cultivaron cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC durante 12 días, ya sea en el medio de cultivo que se enseña en la presente memoria que carece de T3 (situación de control, véase la barra negra en los gráficos) o en el medio de cultivo que se enseña en la presente memoria que comprende 100 ng/ml de T3 (véase la barra blanca en el gráfico). El panel A muestra los efectos de T3 en la velocidad máxima de despolarización. El panel B muestra los efectos de T3 sobre el potencial de membrana en reposo. El panel C muestra los efectos de T3 sobre la amplitud de un potencial de acción. Los resultados muestran que, en comparación con la situación de control, los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC tratadas con T3 muestran una mejora en varios parámetros electrofisiológicos, incluyendo un aumento de la velocidad máxima de despolarización (véase el panel A), un potencial de membrana en reposo inferior (véase el panel B) y mayor amplitud del potencial de acción (véase el panel C). Datos presentados como media +/- SEM.

La **figura 3** muestra los efectos de T3 en la maduración de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC en cultivo *in vitro*. La madurez de los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC se reveló por sus propiedades metabólicas, que se evaluaron mediante un ensayo TMRM, que usa el éster metílico tetrametilrodamina de tinte fluorescente rojo potenciométrico, comúnmente conocido como TMRM. El tratamiento con TMRM da como resultado una acumulación de TMRM impulsada por el potencial de la membrana mitocondrial dentro de la región de la membrana interna de las mitocondrias de funcionamiento saludable. Los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC se cultivaron durante 17 días en una composición de medio de cultivo (CM) que se enseña en la presente memoria, que carece de T3 (situación de control) o una composición de medio de cultivo (CM) que se enseña en la presente memoria (también mencionada como medio de maduración (MM), que comprende 100 ng/ml de T3. Ambos grupos de tratamiento fueron sometidos a un ensayo TMRM. Los resultados muestran que, en comparación con la situación de control, cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC tratadas con T3 muestra un mayor aumento en la fluorescencia naranja asociada a TMRM que indica una actividad mitocondrial mejorada.

### Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente, pero no se limita, mediante los siguientes ejemplos. A partir de la discusión anterior y estos ejemplos, un experto en la técnica puede determinar las características esenciales de la presente invención, y sin apartarse de la enseñanza y el alcance de la misma, puede hacer diversos cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones. De este modo, diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en la presente memoria serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. Tales modificaciones también pretenden caer dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

#### Ejemplo 1. Diferenciación en cuerpos embrionarios de espín (EB)

Las PESC humanas (hPESC) o Las iPSC humanas (hiPSC) se cultivaron en medio de células madre en fibroblastos de ratón inactivados mitóticamente y se pasaron usando TrypLE Select (Invitrogen). El medio de células madre contiene DMEM/F12 (Gibco, cat. No. 11320-033), 20% (v/v) de reemplazo de suero de deficiencia genética (Gibco, cat. No. 10828-028), aminoácidos no esenciales 10 mM (Gibco, cat. no. 11140-050), L-glutamina 2 mM (Gibco, cat. no. 25030-081) 2b-mercaptoetanol (Gibco, cat. no. 21985-023), 10 ng/ml de bFGF humano.

Un día antes de la diferenciación, las células se pasaron sobre placas de 6 pocillos recubiertas con matrigel a una densidad de 1 millón de células/pocillo en medio de células madre.

Las células se diferenciaron en cuerpos embrioides (EB). En el día 0, las células se recogieron y se volvieron a suspender a  $6 \times 10^4$  células/ml en medio de diferenciación básico (libre de suero) que se enseña en la presente memoria que comprende una mezcla de lípidos (2,2 microgramos/ml de colesterol, 0,1 microgramos/ml de ácido linoleico, 0,1 microgramos/ml de ácido linolénico y 0,1 microgramos/ml de ácido palmítico), insulina (1 mg/L), transferrina (0,55 mg/L), selenio (0,00067 mg/L), mezcla de oligoelementos B como se describe en la presente memoria (0,01% ), La mezcla de oligoelementos C como se describe en la presente memoria (0,1%), 20 ng/ml de BMP4 (R&D Systems) y 30 ng/ml de activina A (R&D Systems), 30 ng/ml de VEGF (R&D systems), 40 ng/ml de SCF (R&D systems) y Chir99021 1,5  $\mu$ M (Axon medchem). Se colocó una cantidad de 50  $\mu$ l

de esta mezcla en cada pocillo de una placa no adherente de fondo redondo de 96 pocillos produciendo EB compuestos por 3.000 células. En los días 3, 7, 10, 14 y 17, el medio fue reemplazado por medio de diferenciación sin factores de crecimiento.

5 Los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal producidos por este procedimiento son apropiados para su uso en el procedimiento de la invención que se enseña en la presente memoria, esto es, dichos cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal se pueden madurar en cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto usando la composición del medio de cultivo, así como los procedimientos de generación de cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto que se enseñan en la presente memoria.

### Ejemplo 2. Diferenciación en monocapa

10 Las PESC humanas o las iPSC humanas se cultivaron en monocapa según el procedimiento descrito en Dambrot et al (2014), Exp. Cell. Res. (in press) (<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.05.001>). En resumen, las células se cultivaron en platos de cultivo de tejidos recubiertos con Matrigel (BD Biosciences) en mTeSR1 según el protocolo del fabricante (Stem Cell Technologies). Para iniciar la diferenciación a los cardiomiocitos, las células se disociaron en pequeños grupos de células y se sembraron en un plato de cultivo celular recubierto con Matrigel en mTeSR1. Tres días después (día de diferenciación (d) 0), el medio fue reemplazado con bajo nivel de insulina (1 mg/L), medio (LI)-BPEL y suplementado con BMP4 (día 0 - día 3), Activina A (día 0 - día 3), CHIR99021 (día 0 - día 3) y XAV939 (día 3 - día 6). Desde el día 6 en adelante, BMP4, Activina A, CHIR99021 y XAV939 estuvieron ausentes del medio.

20 Los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal producidos por este procedimiento son apropiados para usar en el procedimiento de la invención que se enseña en la presente memoria, esto es, dichos cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal se pueden madurar en cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto usando la composición del medio de cultivo, así como los procedimientos de generación de cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto que se enseña en la presente memoria.

### Ejemplo 3. Generación de cardiomiocitos (maduros) de tipo adulto a partir de cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal en cultivo *in vitro*.

25 El plástico de cultivo de tejidos se revistió usando Matrigel (Corning) a una concentración de 1/100 en DMEM, durante 45 minutos a temperatura ambiente. Una suspensión de células individuales proveniente de cuerpos embrioides disociados, monocapas disociadas o cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal congelados (obtenidos comercialmente), todos derivados de PESC y/o iPSC en cultivo *in vitro*, se sembraron a una densidad apropiada en plástico de cultivo de tejidos recubierto con matrigel (por ejemplo, en 20-40k células por pocillo de una placa de 96 pocillos, por ejemplo, 20-200k por pocillo de una placa de 12 pocillos). El día 1 después de la siembra en placas, los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal se expusieron a una composición de medio de cultivo de la invención, que consiste en una composición de medio de cultivo libre de suero que comprende 50 ng/ml de T3 (Sigma T6397), 2 mM de carnitina, 5 mM de creatina, 5 mM de taurina, 2,2 microgramos/ml de colesterol, 0,1 microgramos/ml de ácido linoleico, 0,1 microgramos/ml de ácido linolénico, 0,1 microgramos/ml de ácido palmítico (lípidos, por ejemplo, de Gibco 11905), 10 mg/ml de insulina, 5,5 mg/ml de transferrina, 0,0067 mg/ml de selenio (insulina, transferrina y selenio de, por ejemplo, Gibco 51500), 0,01% de la mezcla de oligoelementos B (como se describe en la presente memoria; Cellgro 99-175-CL), 0,1% de la mezcla de oligoelementos C (como se describe en la presente memoria; Cellgro 99-176-CL), 0,5% p/p de antibióticos (mezcla de penicilina-estreptomocina Gibco disponible comercialmente (Gibco 12070; 5000 U/ML), ácido ascórbico 0,05 mg/ml, suplemento de Glutamax 2 mM (esto es, dipéptido L-alanil-L-glutamina en Na-Cl al 0,85%, disponible comercialmente en Gibco, por ejemplo Gibco 35050), 0,125 % p/p de alcohol polivinílico (PVA), 450 nM de alfa monotioglicerol (MTG) (disponible comercialmente), 0,25% p/p de BSA (Bovostar BSAS1.0) en 46,5% (p/p) IMDM (Gibco 21056) y 46,5% (p/p) HAM F-12 con glutamax (Gibco 31765). Todas las concentraciones se expresan como concentración final en la composición del medio de cultivo.

Al día siguiente, se actualizó la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria. Esta etapa se repitió cada 2-3 días hasta el día 15.

50 Alternativamente, el tratamiento con la composición del medio de cultivo como se describió anteriormente que comprende 50 ng/ml de T3 se puede iniciar en el día 3 o el día 7 después de sembrar en placa los cardiomiocitos de tipo fetal, y continuar durante el resto del experimento, esto es, el día 15. En este caso, las células se mantienen en la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria, pero sin T3 hasta que se inicia el tratamiento con la composición del medio de cultivo como se describe anteriormente que comprende 50 ng/ml de T3. También se pueden usar diversos otros medios dentro del contexto de los medios divulgados en la presente memoria, pero con una concentración variable de componentes individuales. Se obtuvieron los mejores resultados usando medios compuestos de componentes en concentraciones como se divulga específicamente en la presente memoria.

### Ejemplo 4. Evaluación de los efectos de T3 sobre las características morfológicas.

Los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC en cultivo *in vitro* se dividieron en dos grupos experimentales. El primer grupo se expuso a una composición de medio de cultivo que se enseña en la presente memoria pero que carecía de T3 (situación de control). El segundo grupo se expuso a una composición de medio de cultivo que se enseña en la presente memoria pero que comprende T3 (100 ng/ml). Ambos grupos se incubaron en su respectiva composición de medio de cultivo durante 5 días. Al término del tratamiento, los cardiomiocitos de ambos grupos experimentales se fijaron en paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con solución salina regulada con fosfato (PBS)/Triton X-100 al 0,1% (Sigma-Aldrich) y se bloquearon con solución salina regulada con fosfato (PBS)/Triton X-100 al 0,1% (Sigma-Aldrich) BSA al 1%. Las muestras se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos primarios específicos para lo siguiente: alfa-actinina (Eptomics Ab 68167) (a una concentración de 1/400). El anticuerpo primario se detectó con anticuerpos secundarios conjugados Cy3 o Alexa-Fluor 647 (a una concentración de 1/250). Las imágenes se capturaron usando un microscopio confocal de escaneo láser ya sea Leica SP5-STED o Leica SP5 (Leica Microsystems).

Los resultados se presentan en la figura 1. Específicamente, los resultados muestran que los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC en cultivo *in vitro*, que fueron expuestos a la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria que comprende T3 (véanse los Paneles E y F en la figura 1), maduró de manera más eficiente y más robusta en cardiomiocitos de tipo adulto, como lo demuestran los cambios en sus características morfológicas, que recordaban una etapa adulta (o de tipo adulto), tal como la polarización de las células, la organización sarcomérica mejorada y forma alargada. Tales cambios en las características morfológicas se observaron con menos claridad en los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal no expuestos a T3 durante el procedimiento de maduración en cultivo *in vitro* (véanse los paneles A-D en la figura 1), lo que muestra la importancia de T3, en particular T3 en la composición del medio de cultivo como se detalla en la presente memoria, en el procedimiento de maduración *in vitro*.

#### **Ejemplo 5. Evaluación de los efectos de T3 sobre las propiedades electrofisiológicas.**

Los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC en cultivo *in vitro* se dividieron en dos grupos experimentales. El primer grupo se expuso a una composición de medio de cultivo que se enseña en la presente memoria pero que carecía de T3 (situación de control). El segundo grupo se expuso a una composición de medio de cultivo que se enseña en la presente memoria pero que comprende T3 (100 ng/ml). Ambos grupos fueron incubados en su respectiva composición de medio de cultivo durante 12 días. Al término del tratamiento, los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal de ambos grupos experimentales fueron sometidos a un procedimiento patch clamp.

La electrofisiología con patch clamp se realizó según lo descrito por Bellin, M. et al. EMBO J 32, 3161-3175 (2013), usando modificaciones menores. Los potenciales de acción de pequeños grupos de células (5-10 células) se midieron con la técnica de patch-clamp perforada usando un amplificador Axopatch 200b (Molecular Devices) y pipetas de parche de baja resistencia (1.5-2,5 M $\Omega$ ). La adquisición de datos y los análisis de potenciales de acción se realizaron con pClamp 10 (instrumentos axon) y software a medida. Los potenciales de acción se corrigieron para el potencial de unión líquido calculado (-15 mV).

Los potenciales de acción de las células de golpe espontáneas se midieron a 37 $\pm$ 0,20 °C usando una solución de Tyrode modificada que contenía (en mM): NaCl 140, KCl 5,4, CaCl<sub>2</sub> 1,8, MgCl<sub>2</sub> 1,0, glucosa 5,5, HEPES 5,0; pH 7,2 (NaOH). La solución de la pipeta contenía (en mM): Kgluconato 125, KCl 20, NaCl 5, anfotericina-B 0,22, HEPES 10; pH 7,2 (KOH). El potencial de membrana en reposo (RMP), la velocidad máxima de despolarización (dV/dt max), la amplitud AP en mV (APA) y la duración AP en milisegundos (APD) a 20, 50 y 90% de repolarización (APD<sub>50</sub> y APD<sub>90</sub>, respectivamente) fueron analizados. La velocidad de despolarización se calculó a partir de la primera derivada del cambio de voltaje en función del tiempo. De este modo, la velocidad máxima de despolarización (dV/dt max) es igual al valor positivo máximo de la primera derivada del potencial de acción. Se promediaron los datos de 10 potenciales de acción consecutivos.

Los resultados se muestran en la figura 2. Específicamente, los resultados muestran que los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC en cultivo *in vitro* que fueron expuestos a la composición del medio de cultivo que comprende T3, maduraron de manera más eficiente y más robusta en cardiomiocitos de tipo adulto, como lo demuestran los cambios en sus características electrofisiológicas que recuerdan a una etapa adulta (o de tipo adulto), tal como el aumento de la velocidad máxima de despolarización (véase el panel A de la figura 2), potencial de membrana en reposo inferior (véanse panel B de la figura 2) y una mayor amplitud del potencial de acción (véase el panel C de la figura 2) en comparación con los datos obtenidos para los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal, que no fueron expuestos a T3 durante el procedimiento de maduración en cultivo *in vitro* (véanse las barras negras en los paneles A, B y C de la figura 2).

#### **Ejemplo 6. Evaluación de los efectos de T3 sobre el perfil metabólico.**

Los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC en cultivo *in vitro* se dividieron en dos grupos experimentales. El primer grupo se expuso a una composición de medio de cultivo que se enseña en la presente memoria pero que carecía de T3 (situación de control). El segundo grupo se expuso a una composición de medio de cultivo que se enseña en la presente memoria pero que comprende T3 (100 ng/ml). Ambos grupos fueron

incubados en su respectiva composición de medio de cultivo durante 17 días. Se agregó una cantidad de TMRM 5 nM (Invitrogen) en los medios respectivos el día antes de la medición. Las células se disociaron usando 5x Tryple, pero con TMRM incluido en todas las soluciones y también presente durante la medición. Las mediciones se realizaron en un citómetro de flujo Miltenyi MACSquant VYB.

- 5 Los resultados se muestran en la figura 3. Específicamente, los resultados muestran que los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal derivados de PESC en cultivo *in vitro* que fueron expuestos a la composición del medio de cultivo que se enseña en la presente memoria que comprende T3, maduraron de manera más eficiente y más robusta en cardiomiocitos de tipo adulto, como lo demuestran los cambios en su perfil metabólico, que recordaban una etapa adulta (o de tipo adulto), tal como el aumento de la actividad mitocondrial, y en comparación con los cardiomiocitos (inmaduros) de tipo fetal que no estaban expuestos a T3 durante el procedimiento de maduración en cultivo *in vitro*.
- 10

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición de medio de cultivo acuoso, en la que dicha composición de medio de cultivo no contiene suero y comprende:
  - un agonista del receptor de la hormona tiroidea;
- 5       - una mezcla de lípidos;
- un compuesto de creatina y/o un compuesto de taurina; y
- un compuesto de carnitina.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que el agonista del receptor de la hormona tiroidea se selecciona del grupo que consiste en T3, DITPA, GC-1, RO, CO23, y KB2115.
- 10       3. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende aproximadamente 25 ng/ml a aproximadamente 150 ng/ml de T3 y/o aproximadamente 1 microM a aproximadamente 2 microM de DITPA.
4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la mezcla de lípidos comprende colesterol y uno o más lípidos seleccionados de ácido linolénico, ácido linoleico y ácido palmítico.
- 15       5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende aproximadamente 1 microgramo/ml a aproximadamente 4 microgramos/ml de colesterol.
6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la mezcla de lípidos comprende además uno o más componentes seleccionados del grupo de: ácido araquidónico, acetato de DL-alfa-tocoferol, alcohol etílico, ácido mirfístico, ácido oleico, ácido palmitoleico, plurónico F-68, ácido esteárico y Tween 80.
- 20       7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 3,5 mM de carnitina.
8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende aproximadamente 3,0 mM a aproximadamente 7,0 mM de creatina y/o aproximadamente 2 mM a aproximadamente 7 mM de taurina.
- 25       9. Una composición sólida, preferiblemente una composición en polvo, en la que la composición se puede disolver en una solución acuosa para obtener la composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
10. Procedimiento de generación de cardiomiocitos de tipo adulto a partir de cardiomiocitos de tipo fetal diferenciados de células madre embrionarias pluripotentes (PESC) y/o células madre pluripotentes inducidas (iPSC), que comprende las etapas de:
  - (a) proporcionar *in vitro* el uno o más cardiomiocito(s) de tipo fetal;
  - (b) poner en contacto dichos cardiomiocitos de tipo fetal con la composición del medio de cultivo según las reivindicaciones 1-9 para permitir la maduración de dichos cardiomiocitos de tipo fetal en cardiomiocitos de tipo adulto.
- 30       11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que los cardiomiocitos de tipo fetal están en contacto con la composición del medio de cultivo durante aproximadamente 3 días hasta aproximadamente 15 días.
12. Uso de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para madurar cardiomiocitos derivados de PESC y/o iPSC *in vitro*.
- 40       13. Kit apropiado para la generación de células de cardiomiocitos de tipo adulto en cultivo *in vitro*, que comprende:
  - la composición del medio de cultivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

Figura 1

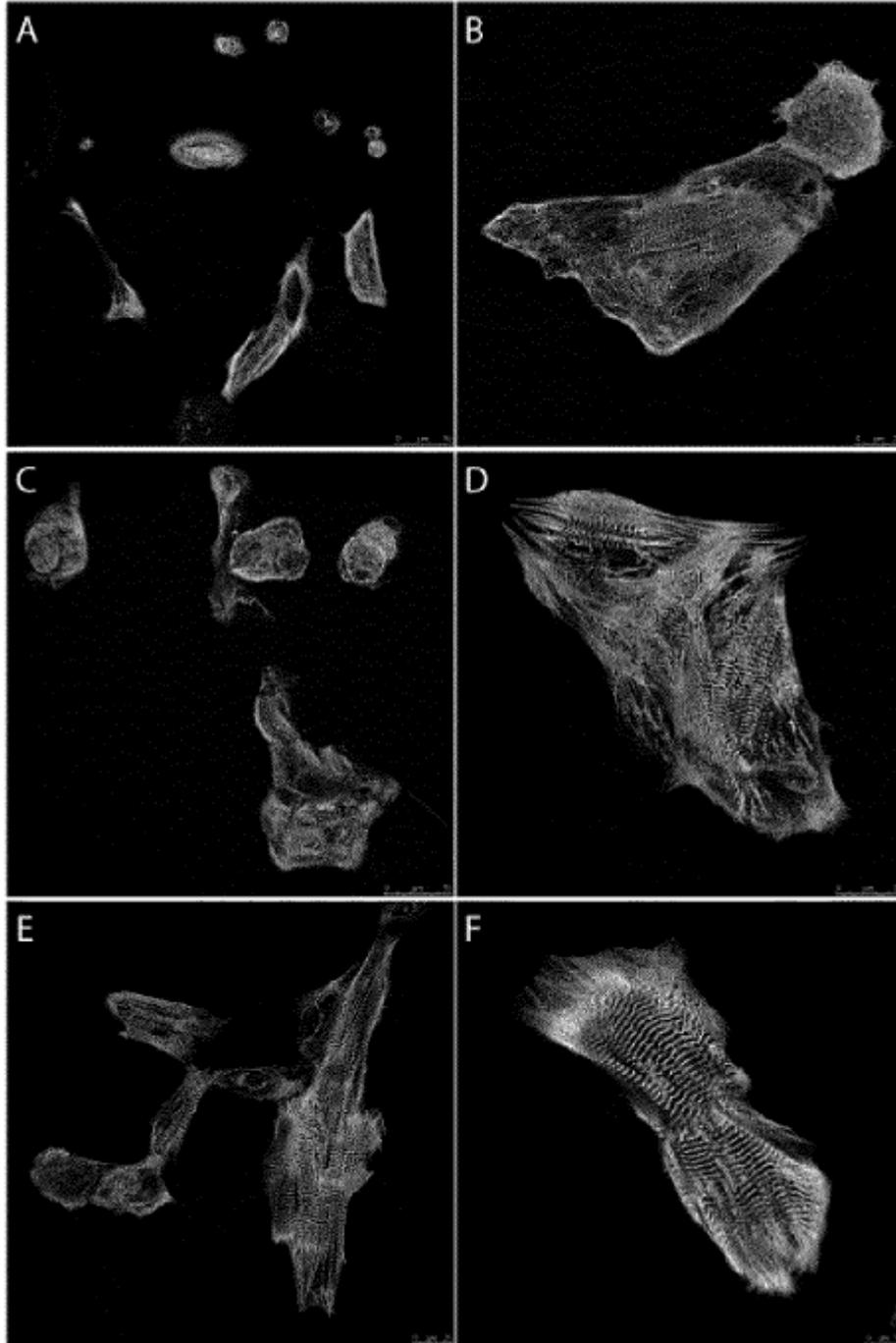


Figura 2

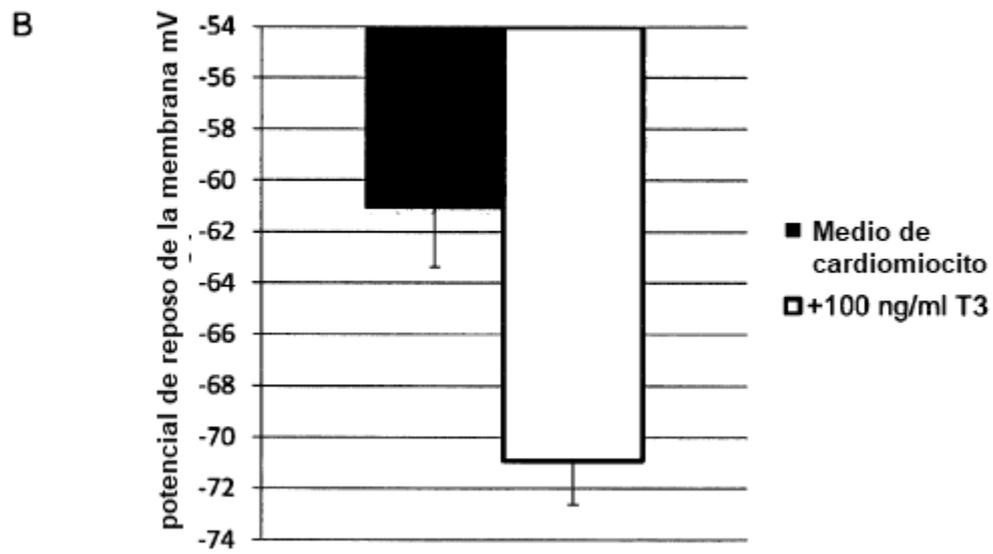
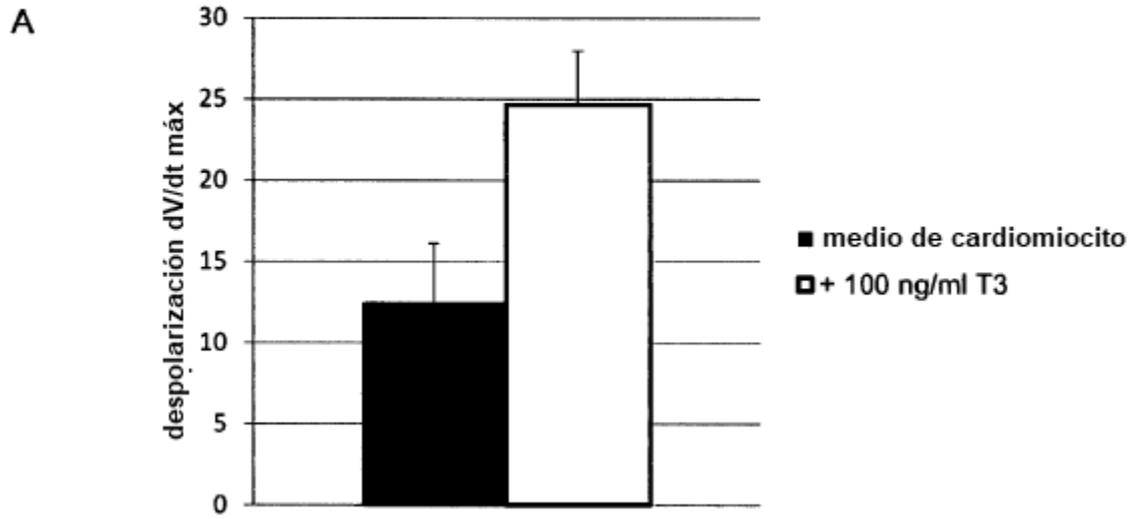


Figura 2

C

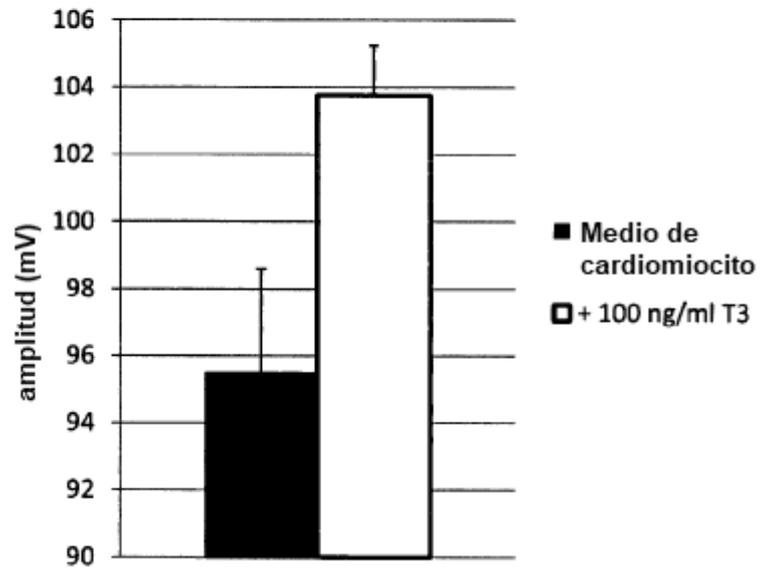


Figura 3

