

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 895 676**

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2016 PCT/NL2016/050609**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2017 WO17039445**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2016 E 16767044 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.09.2021 EP 3344758**

54 Título: **Un método in vitro para diferenciar una población de células madre pluripotentes humanas en una población de células cardiomiocitos**

30 Prioridad:

01.09.2015 NL 2015385

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

22.02.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BRAAM, STEFAN ROBBERT y
GRANDELA, ANA CATARINA MARTINS**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 895 676 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

Un método in vitro para diferenciar una población de células madre pluripotentes humanas en una población de células cardiomiocitos

5

Diferenciación

Estado de la técnica

10

El progreso en varias áreas de la medicina (es decir, salud mental, cardiología, inmunidad, etc.), donde se necesitan medicamentos nuevos y más efectivos, se ve gravemente obstaculizado por el coste extremo engendrado por la falta de eficacia y los efectos adversos no deseados inducidos por medicamentos asociados con varios compuestos líderes candidatos en el proceso de descubrimiento de fármacos. Un inconveniente importante del proceso actual de descubrimiento de fármacos, para todo el desarrollo de fármacos, es la alta tasa de desgaste de los compuestos principales causada por la falta de eficacia y los efectos adversos imprevistos de los fármacos, que a menudo se detectan en las últimas fases del descubrimiento del fármaco en lugar de los proyectos en proceso de descubrimiento de fármacos.

15

20

Los recientes avances en la biología de las células madre pluripotentes permiten ahora generar cardiomiocitos humanos in vitro tanto a partir de individuos sanos como de pacientes con anomalías cardíacas. Esto ofrece oportunidades sin precedentes para estudiar el desarrollo de enfermedades cardíacas “en un plato” y establecer plataformas novedosas para el descubrimiento de fármacos, para estudiar mecanismos y moléculas para prevenir la progresión de la enfermedad y revertirla.

25

La prevención de la cardiotoxicidad inducida por fármacos, que puede manifestarse como arritmias cardíacas, representa la máxima prioridad para las agencias reguladoras y las compañías (bio) farmacéuticas, ya que la manifestación de este tipo de toxicidad es inmediatamente potencialmente mortal. Se ha demostrado que el 33 % de los eventos adversos de seguridad en los estudios clínicos se atribuyen generalmente a efectos cardíacos arrítmicos, que pueden provocar muerte súbita o complicaciones cardíacas graves en los sujetos (Mordwinkin et al (2013) Journal of cardiovascular translational research, Vol: 6 (1): 22-30).

30

35

Por lo tanto, existe una necesidad urgente de nuevas estrategias rentables para mejorar el proceso tradicional de desarrollo/descubrimiento de fármacos, por ejemplo, eliminar los efectos cardiotoxicos inducidos por fármacos. En particular, existe una necesidad urgente insatisfecha de predecir la cardiotoxicidad inducida por fármacos en una etapa temprana en el desarrollo de proyectos en proceso 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 biológicos, incluido el uso de células madre pluripotentes, ensayos de canales de iones 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. Las células madre pluripotentes son una fuente potencial de células para generar cardiomiocitos en cultivo in vitro.

40

45

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, el descubrimiento y la validación de objetivos, así como para el desarrollo de nuevos fármacos cardíacos en general, donde los cardiomiocitos se pueden usar para descubrir nuevos objetivos de medicamentos y evaluar la seguridad de los medicamentos para el corazón.

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 cultivos de células madre pluripotentes in vitro.

55

En la técnica, se conocen varios métodos para producir y obtener cardiomiocitos derivados de cultivo de células madre pluripotentes in vitro, ejemplos recientes de los cuales incluyen WO2014200339, WO2011056416, WO2015004539, WO2012026491 y WO2014078414. En el documento WO2014078414 mencionado anteriormente se divulgan métodos para la diferenciación de células madre potentes humanas en cardiomiocitos ventriculares.

60

Al mismo tiempo, con respecto a la producción de cardiomiocitos a partir de células madre pluripotentes usando técnicas de cultivo in vitro, se acepta generalmente que el proceso de diferenciación cardíaca es muy delicado. Los métodos adecuados para las células madre pluripotentes de una especie o fuente pueden no ser adecuados para otras especies o fuentes. Otro problema es que los compuestos utilizados para estimular la diferenciación de las células madre pluripotentes son a menudo específicos, en particular cuando se requieren concentraciones relativamente altas de dicho compuesto, modulando varios objetivos (enzimas, vías de señalización) en la célula, tanto deseados como no deseados, lo que en particular puede ser problemático cuando se usa más de un compuesto a-específico para diferenciar las células madre pluripotentes.

65

Por esa razón, existe un deseo constante de métodos mejorados de cultivo que permitan una producción in vitro reproducible y robusta de poblaciones de células de cardiomiocitos derivadas de células madre pluripotentes humanas. En particular, existe la necesidad de métodos que puedan adoptarse para diferentes fuentes de células madre pluripotentes humanas, incluidas células madre embrionarias o varios tipos de células madre pluripotentes incluidas.

5

Descripción de la invención

Definiciones

10

Se utilizan varios términos relacionados con los métodos, composiciones, usos y otros aspectos de la presente invención a lo largo de la especificación y las reivindicaciones. A tales términos se les debe dar su significado corriente en la técnica a la que pertenece la invención, a menos que se indique lo contrario. Otros términos definidos específicamente deben interpretarse de una manera coherente con la definición proporcionada en el presente documento. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento puede usarse en la práctica para probar la presente invención, los materiales y métodos preferidos se describen en este documento.

15

“Un”, “una” y “el”: estos términos en forma singular incluyen referentes en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a “una célula” incluye una combinación de dos o más células y similares.

20

“Aproximadamente” y “aproximadamente”: estos términos, cuando se refieren a un valor medible como una cantidad, una duración temporal y similares, pretenden abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferiblemente $\pm 5\%$, incluso más preferiblemente $\pm 1\%$, y aún más preferiblemente $\pm 0.1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados.

25

“Cardiomiocitos de tipo adulto” o “cardiomiocitos maduros”: esto se refiere a cardiomiocitos que poseen el fenotipo y/o genotipo deseado en relación con un cardiomiocito adulto. En una realización, una célula madura tiene el fenotipo y/o genotipo de, pero no se limita a, un cardiomiocito adulto o un cardiomiocito auricular o un cardiomiocito ventricular o un cardiomiocito del ganglio SA o un cardiomiocito del ganglio SA periférico o un cardiomiocito del ganglio SA central. En otras realizaciones, los cardiomiocitos de tipo adulto o cardiomiocitos maduros exhiben patrones de electrofisiología maduros y/o patrones de manipulación de calcio maduros, y/o expresión de canal iónico de tipo adulto y/o señales electrofisiológicas de tipo adulto y/o propiedades contráctiles de tipo adulto y/o patrones de expresión génica de tipo adulto, y/o fenotipos físicos (morfológicos) de tipo adulto en comparación con cardiomiocitos de tipo fetal (inmaduros) derivados de cultivos in vitro de células madre. Los cardiomiocitos de tipo adulto también pueden albergar un mayor grado de organización de las miofibrillas y estrías de sarcómero, que son características que están poco o insuficientemente desarrolladas en los cardiomiocitos de tipo fetal (inmaduros).

30

35

“Cardiomiocitos” o “miocitos cardíacos”: esto se refiere a cualquier célula de linaje de cardiomiocitos, y puede aplicarse a las células en cualquier etapa de la ontogenia de los cardiomiocitos, a menos que se especifique lo contrario. Por ejemplo, los cardiomiocitos pueden incluir tanto células precursoras o progenitoras de cardiomiocitos (es decir, células que son capaces, sin desdiferenciación o reprogramación, de dar lugar a una progenie que incluye cardiomiocitos, por ejemplo, cardiomiocitos inmaduros o cardiomiocitos fetales) y cardiomiocitos maduros (cardiomiocitos de tipo adulto). Los cardiomiocitos incluyen cardiomiocitos de tipo auricular, cardiomiocitos de tipo ventricular y/o cardiomiocitos del sistema conductor (ver, por ejemplo, Maltsev et al, Mech Dev. 1993 Nov; 44 (1): 41-50 o Cardiac Regeneration using Stem Cells (10 de abril de 2013); Keiichi Fukuda, Shinsuke Yuasa CRC Press. ISBN 9781466578401). Los progenitores de cardiomiocitos, como los cardiomiocitos maduros, pueden expresar marcadores típicos del linaje de cardiomiocitos, que incluyen, sin limitación, troponina I cardíaca (cTnI), troponina T cardíaca (cTnT), cadena pesada de miosina sarcomérica (MHC), GATA-4, Nkx2.5, N-cadherina, β 1-adrenoceptor (β 1-AR), ANF, la familia de factores de transcripción MEF-2, creatinina MB (CK-MB), mioglobina o factor natriurético auricular (ANF).

50

“Que comprende”: este término se interpreta como inclusivo y abierto, y no exclusivo. Específicamente, el término y variaciones del mismo significan que se incluyen las características, etapas o componentes especificados. Estos términos no deben interpretarse para excluir la presencia de otras características, etapas o componentes.

55

“Técnicas convencionales” o “métodos conocidos por el experto en la materia”: estos términos se refieren a una situación en la que los métodos para llevar a cabo las técnicas convencionales utilizadas en los métodos de la invención serán evidentes para el experto en la materia. La práctica de técnicas convencionales en biología molecular, bioquímica, cultivo celular, genómica, secuenciación y campos relacionados son bien conocidas por 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) by Peterson, S., and Loring, J. F. (2012).

60

“Diferenciar” y “diferenciación”: estos términos, en el contexto de células vivas, se refieren a la progresión de una célula más abajo en la ruta de desarrollo. Una “célula diferenciada” es una célula que ha progresado más en la ruta de desarrollo que la célula con la que se está comparando; la diferenciación es el proceso de progresión. Las células madre pluripotentes humanas pueden diferenciarse en células progenitoras de linaje restringido (células que, como una célula

65

madre, tienen una tendencia a diferenciarse en un tipo específico de célula, pero que ya están más diferenciadas que una célula madre y son empujadas a diferenciarse eventualmente en su célula en etapa terminal; por ejemplo, endodermo, mesodermo y ectodermo), que a su vez pueden diferenciarse en células más restringidas (por ejemplo, progenitores de cardiomiocitos, progenitores de células neuronales), que pueden diferenciarse en células diferenciadas terminalmente (por ejemplo, cardiomiocitos o neuronas). 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 involucran proteínas incrustadas en la superficie celular. En la presente invención, “diferenciación” es el proceso biológico mediante el cual una célula madre pluripotente humana no especializada (población) adquiere las características de una célula especializada tal como un cardiomiocito en condiciones controladas en cultivo in vitro. Las células madre pluripotentes humanas pueden exponerse a las composiciones y métodos de los medios de cultivo de la invención para promover la diferenciación de las células madre pluripotentes humanas en cardiomiocitos (de tipo fetal). La diferenciación cardíaca se puede detectar mediante el uso de marcadores seleccionados de, entre otros, NKX2-5, GATA4, cadena pesada de miosina, cadena ligera de miosina, alfa-actinina, troponina y tropomiosina (Burrige et al (2012) Stem Cell Cell, Vol. 10 (1): 16-28, US2013/0029368). En el contexto de la presente invención, la población de células madre pluripotentes humanas se diferencia en cardiomiocitos.

“Células madre embrionarias”: abreviado como 'células ES' o ESC (o si son de origen humano 'células hES' o 'hESCs') se refiere a células madre que se derivan de la masa celular interna de un blastocisto. El experto en la materia comprende cómo obtener dichas células madre embrionarias, por ejemplo, como lo describe Chung (Chung et al (2008) Stem Cell Lines, Vol 2 (2): 113-117), que emplea una técnica que no causa la destrucción del embrión o de los embriones de donantes. Varias estirpes ESC se enumeran en el NIH Human Embryonic Stem Cell Registry. Las células madre embrionarias pluripotentes se pueden distinguir de otros tipos de células mediante el uso de marcadores o marcadores específicos de linaje que incluyen, entre otros, Oct-4, Nanog, GCTM-2, SSEA3 y SSEA4.

“Ejemplar”: este término significa “que sirve como ejemplo, instancia o ilustración”, y no debe interpretarse como que excluye otras configuraciones divulgadas en el presente documento.

“Cardiomiocitos de tipo fetal” o “cardiomiocitos inmaduros”: Cardiomiocitos derivados de cultivo in vitro de células madre pluripotentes, que no posee (todavía) el fenotipo y/o genotipo deseado en relación con un cardiomiocito adulto o similar a un adulto. Dichos cardiomiocitos inmaduros pueden tener la capacidad de diferenciarse en cardiomiocitos más maduros. Por ejemplo, dichos cardiomiocitos de tipo fetal (inmaduros) pueden exhibir automaticidad (contracción espontánea) y/o expresión del canal iónico de tipo fetal, y/o señales electrofisiológicas de tipo fetal, y/o patrones de expresión génica de tipo fetal, y/o -tipo de fenotipos físicos. Los cardiomiocitos de tipo fetal (inmaduros) se pueden distinguir de otros tipos de células mediante el uso de marcadores o marcadores específicos de linaje que incluyen, entre otros, MYH6, TNNT2, TNNI3, MLC2V, EMILIN2, SIRPA, VECAM y otros marcadores adecuados para evaluar una etapa de desarrollo fetal o similar al feto (Burrige et al (2012) Stem Cell Cell, Vol.10 (1): 16-28, US2013/0029368).

“Célula madre pluripotente inducida” o “iPSC”: estos términos se refieren a células madre pluripotentes que se derivan de una célula que no es una célula madre pluripotente (es decir, de una célula que se diferencia con respecto a una célula madre pluripotente). Las células madre pluripotentes inducidas pueden derivarse de múltiples tipos de células diferentes, incluidas las células diferenciadas terminalmente. Las células madre pluripotentes inducidas generalmente tienen una morfología similar a la de las células madre embrionarias, creciendo como colonias planas con grandes proporciones nucleocitoplasmáticas, bordes definidos y núcleos prominentes. Además, la célula madre pluripotente inducida puede expresar uno o más marcadores de pluripotencia clave conocidos por un experto en la técnica, que incluyen, entre otros, fosfatasa alcalina, SSEA3, SSEA4, Sox2, Oct3/4, Nanog, TRA160, TRA181, TDGF. 1, Dnmt3b, FoxD3, GDF3, Cyp26a1, TERT y zfp42. Se pueden encontrar ejemplos de métodos para generar y caracterizar células madre pluripotentes inducidas, por ejemplo, en las publicaciones de patente de EE. UU. Números US20090047263, US20090068742, US20090191159, US20090227032, US20090246875 y US20090304646. Para generar células madre pluripotentes inducidas, se pueden proporcionar células somáticas con factores de reprogramación (por ejemplo, Oct4, SOX2, KLF4, MYC, Nanog, Lin28, etc.) conocidos en la técnica para reprogramar las células somáticas para que se conviertan en células madre pluripotentes (ver, para ejemplo, Takahashi et. al, Cell.2007 30 de noviembre; 131 (5): 861-72; Takahashi et. al, Nat Protoc.2007; 2 (12): 3081-9; Yu et. al, Science.2007 21 de diciembre: 318 (5858): 1917-20. Publicación electrónica, 20 de noviembre de 2007).

“Marcadores” o “marcadores específicos de linaje”: estos términos se refieren a una característica asociada con el fenotipo de las células de un linaje y pueden usarse para evaluar la diferenciación de células. Los términos pueden referirse, por ejemplo, a moléculas de ácido nucleico o polipéptido que se expresan de forma diferencial en una célula de interés. El nivel detectable del marcador es suficientemente más alto o más bajo en las células de interés en comparación con otras células, de modo que la célula de interés puede identificarse y distinguirse de otras células usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica.

“Medio”: este término se refiere a una solución acuosa, que incluye tampones, adecuada para mantener las células humanas o animales durante un período suficiente. Por ejemplo, un medio es adecuado si permite el tratamiento de células durante un período necesario para obtener el efecto deseado por el tratamiento. El término “medio” también, y preferiblemente, incluye medios de crecimiento que son adecuados para el cultivo celular in vitro y/o la diferenciación de células humanas o animales. Un “medio definido” se refiere a un medio (de crecimiento) adecuado para el cultivo celular

in vitro de células humanas o animales y en el que se conocen todos los componentes químicos. Dichos medios definidos no comprenden o esencialmente no comprenden ninguna fuente mal definida de nutrientes y/u otros factores mal definidos. Dentro del contexto de la presente invención, el medio definido utilizado puede contener cantidades definidas de productos como albúmina (purificada), factores de crecimiento y hormonas, pero es esencialmente libre de suero (es decir, el suero tiene menos del 1 % p/p, preferiblemente menos del 0.5 % p/p, incluso más preferiblemente menos del 0.1 % p/p, incluso más preferiblemente menos del 0.05 % p/p del medio listo para usar, lo más preferiblemente el medio está libre de suero (es decir, 0 % p/p) suero; aunque puede contener una cantidad definida de compuestos específicos como albúmina (recombinante). Aunque se usa ampliamente, el suero tiene muchas limitaciones. Contiene niveles altos de proteínas y compuestos numerosos y desconocidos que interfieren dramáticamente con las pequeñas cantidades de las proteínas deseadas producidas por las células. La presencia de suero también puede afectar los resultados de las pruebas in vitro con las células obtenidas, ya que algunos compuestos pueden unirse hasta en un 99 % a las proteínas del suero. Otra limitación son las inconsistencias de suero de lote a lote, lo que da lugar a una seria preocupación regulatoria sobre diversas contaminaciones de proteínas séricas en el producto.

“Pluripotencia”: este término lo entiende generalmente el experto y se refiere a un atributo de una célula (madre) 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).

“Célula madre pluripotente” o “PSC”: esta es una célula madre capaz de producir todos los tipos de células del organismo y puede producir células de las capas germinales, por ejemplo, endodermo, mesodermo y ectodermo, de un mamífero y abarca al menos células madre embrionarias pluripotentes y células madre pluripotentes inducidas. Las células madre pluripotentes se pueden obtener de diferentes formas. Las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) pueden derivarse de células somáticas. Las células madre pluripotentes también pueden estar en forma de una estirpe celular establecida.

“Células madre”: las células madre son una población de células indiferenciadas definidas por su capacidad a nivel de una sola célula para autorrenovarse y diferenciarse para producir células progenitoras, incluidas las progenitoras autorrenovables, las progenitoras no renovables y de forma terminal células diferenciadas (Morrison et al. (1997) Cell 88: 287-298). Las células madre tienen la capacidad de dividirse durante períodos indefinidos en cultivo. Las células madre son células que pueden multiplicarse de forma estable y cultivarse in vitro y son células totipotentes, pluripotentes, pluripotentes inducidas, multipotentes, oligopotentes o unipotentes, preferiblemente al menos pluripotentes. Las células madre también se caracterizan por su capacidad para diferenciarse in vitro en células funcionales de varios 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. Las células madre pueden caracterizarse tanto por la presencia de marcadores específicos (por ejemplo, proteínas, ARN, etc.) como por la ausencia de marcadores específicos. Las células madre también pueden identificarse mediante ensayos funcionales tanto in vitro como in vivo, en particular ensayos relacionados con la capacidad de las células madre para dar lugar a una progenie diferenciada múltiple.

“Cardiomiocitos derivados de células madre”: estas células, o población de células de cardiomiocitos, se pueden definir como células espontáneamente contráctiles derivadas por métodos in vitro de una célula pluripotente humana, aunque a veces se pueden obtener células no contráctiles. Dichas células todavía manifiestan otras de las características típicas de las células que se diferenciaron in vitro en cardiomiocitos y que en la técnica también se denominan cardiomiocitos derivados de células madre (obtenidos in vitro). Revisiones recientes que definen y describen cardiomiocitos derivados de células madre han cubierto métodos para crear (por ejemplo, Vidarsson et al. Stem Cell Rev.2010; 6 (1): 108-120, Boheler et al. Circ Res.2002; 91 (3): 189—201. Mummery et al. Circ Res. 2012; 111 (3): 344— 358, y Jiang et al. J Cell Mol Med. 2012; 16 (8): 1663—1668, David et al. Physiology (Bethesda) 2012; 27 (3): 119-129), y purificar (Habib et al. J Mol Cell Cardiol.2008; 45 (4): 462-474) tales cardiomiocitos derivados de células madre, así como su electrofisiología (Blazeski et al., Prog Biophys Mol Biol.2012; 110 (2): 178-195), y estos métodos y medios, por ejemplo, basados en APEL (StemCell Technologies) y StemPro34 (Invitrogen), son bien conocidos por los expertos.

“Célula madre somática”: una célula indiferenciada que se encuentra en un tejido diferenciado que puede renovarse (clonal) y (con ciertas limitaciones) diferenciarse para producir todos los tipos de células especializadas del tejido del que se originó.

“Indiferenciada”: una célula madre que no ha desarrollado una característica de una célula más especializada es una célula indiferenciada. Como reconocerá un experto en la técnica, los términos “indiferenciado” y “diferenciado” son relativos entre sí. Una célula 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 como el tamaño y la forma relativos, la relación entre el volumen nuclear y el volumen citoplasmático; y características de expresión tales como presencia detectable de marcadores (genéticos) de diferenciación conocidos.

65

Descripción detallada de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar un método mejorado para diferenciar las células madre en cardiomiocitos, preferiblemente cardiomiocitos ventriculares.

5 Otro objeto es proporcionar un método para diferenciar células madre humanas, en particular células madre pluripotentes humanas en cardiomiocitos, preferiblemente cardiomiocitos ventriculares.

Es un objeto proporcionar un método que proporcione buenos rendimientos de células, preferiblemente cardiomiocitos ventriculares.

10 Es un objeto proporcionar un método de diferenciación de células madre humanas en cardiomiocitos, en el que el método sea robusto, es decir, altamente repetible en/entre métodos de cultivo de tejidos independientes, haciendo que el método sea fiable y adecuado para su uso en la producción de cardiomiocitos, preferiblemente cardiomiocitos ventriculares, diferenciados de células madre humanas in vitro.

15 Es un objeto proporcionar un método de diferenciación de células madre humanas en cardiomiocitos, preferiblemente cardiomiocitos ventriculares, en el que el método es ampliamente aplicable a células madre humanas obtenidas en diferentes condiciones (por ejemplo, diferentes estirpes celulares) y/o previamente (por ejemplo, antes de la diferenciación de las células madre) mantenidas en cultivo en varias condiciones diferentes (por ejemplo, utilizando diferentes métodos o medios para mantener las células madre humanas en un estado indiferenciado).

20 Es un objeto proporcionar una población de cardiomiocitos homogénea, en la que una gran parte de las células madre se han diferenciado en cardiomiocitos, preferiblemente cardiomiocitos ventriculares.

25 Es un objeto proporcionar un método que proporcione cardiomiocitos, preferiblemente cardiomiocitos ventriculares, a partir de células madre en un periodo de tiempo relativamente corto.

Es un objeto proporcionar una población de cardiomiocitos, preferiblemente cardiomiocitos ventriculares, en donde la población puede obtenerse con el método divulgado en este documento.

30 Es un objeto proporcionar un método de diferenciación de células madre pluripotentes humanas en o hacia una población de cardiomiocitos, preferiblemente una población de cardiomiocitos ventriculares, en el que el método utiliza compuestos estimulantes o promotores de la diferenciación en concentraciones bajas o en concentraciones que no ejercen efectos negativos sobre las células, tales como toxicidad, rendimiento reducido o alteración no deseada de características fenotípicas.

35 Es un objeto proporcionar un método in vitro para apoyar o mejorar la actividad de XAV-939 como inductor y/o estimulador de la diferenciación de células madre pluripotentes humanas hacia una población de cardiomiocitos, preferiblemente cardiomiocitos ventriculares.

40 Es un objeto de la presente invención proporcionar una combinación de compuestos que, cuando se usa para contactar con células madre pluripotentes humanas, proporciona una mejor inducción y/o estimulación de la diferenciación de células madre pluripotentes humanas hacia una población de cardiomiocitos, preferiblemente cardiomiocitos ventriculares, preferiblemente en los que la combinación no tiene un efecto adverso aparente sobre el rendimiento o las características de la población de cardiomiocitos así obtenida.

45 Es un objeto de la presente invención proporcionar un método in vitro de diferenciación de células madre pluripotentes humanas en una población de cardiomiocitos derivados de células madre humanas, preferiblemente cardiomiocitos ventriculares, que se pueden usar para diferentes fuentes de células madre pluripotentes humanas (por ejemplo, obtenidas de diferentes tejidos o métodos, estirpes celulares, células madre pluripotentes inducidas).

50 Es un objeto proporcionar un método in vitro mejorado para la diferenciación de células madre pluripotentes humanas en cardiomiocitos que expresan mlc2v.

55 Es un objeto proporcionar un método in vitro para obtener una población de cardiomiocitos ventriculares a partir de células madre pluripotentes humanas con alto rendimiento y en un periodo de tiempo relativamente corto (por ejemplo, menos de 35 días desde la siembra en placa de las células madre pluripotentes humanas).

Otros objetos resultarán evidentes para el experto a partir de la descripción, las reivindicaciones y los ejemplos proporcionados en el presente documento.

60 Estos objetos se pueden proporcionar con el método, uso, compuestos, productos y kits de la presente invención.

65 Se acepta generalmente que la producción de cardiomiocitos a partir de células madre pluripotentes usando técnicas de cultivo in vitro es muy delicada, y la variabilidad en cada componente individual de la estrategia de diferenciación cardíaca debe optimizarse cuidadosamente para fabricar cardiomiocitos de manera confiable. Los problemas en la técnica se relacionan con la robustez y repetibilidad del proceso dentro de una estirpe de células madre y a través de una variedad

de estirpes. Específicamente, se ha informado que las condiciones de diferenciación deben optimizarse para cada estirpe específica. En particular, la falta de especificidad de los compuestos utilizados para inducir o estimular la diferenciación y la interacción entre dichos compuestos, que pueden causar efectos no deseados tales como rendimiento reducido de las células, alta variabilidad en el progreso de la diferenciación de las células dentro de la población celular y/o características fenotípicas alteradas. Además, cuando se utilizan factores de crecimiento de proteínas, la imprevisibilidad de la estabilidad de estos factores puede complicar aún más la solidez de un método dado.

Se encontró que con el método de la invención se pueden eludir varios de tales problemas, produciendo un método robusto, reproducible y fácil de aplicar de diferenciación de células madre pluripotentes humanas en una población de cardiomiocitos, preferiblemente cardiomiocitos ventriculares.

En un primer aspecto, se proporciona un método de diferenciación de células madre pluripotentes humanas en cardiomiocitos, en el que el método se realiza in vitro.

Se proporciona un método in vitro para diferenciar una población de células madre pluripotentes humanas en una población de células de cardiomiocitos, el método comprende una etapa b), en la que la etapa b) es poner en contacto la población de células madre pluripotentes humanas con XAV-939 y un segundo compuesto en el que el compuesto es IWP-L6 o C59 en un medio acuoso.

Se encontró que se puede usar ventajosamente una combinación de XAV-939 y C59, en particular en los métodos descritos en el presente documento, para diferenciar células madre pluripotentes humanas en cardiomiocitos, preferiblemente cardiomiocitos ventriculares.

Se descubrió además que se puede usar ventajosamente una combinación de XAV-939 e IWP-L6, en particular en los métodos descritos en el presente documento, para diferenciar células madre pluripotentes humanas en cardiomiocitos, preferiblemente cardiomiocitos ventriculares.

En el método, las células madre pluripotentes humanas se ponen en contacto con una cantidad de XAV-939 y un segundo compuesto en el que el compuesto es IWP-L6 o C59. El XAV-939 y el segundo compuesto se proporcionan a las células en una concentración que es eficaz para inducir o promover la diferenciación de las células madre pluripotentes humanas en o hacia una población de cardiomiocitos humanos derivados de células madre. El experto en la materia entenderá que dicha concentración puede, en vista de la divulgación actual, determinarse usando técnicas convencionales.

En el método, se proporciona una población de células madre pluripotentes humanas. La población de células madre pluripotentes humanas puede obtenerse de diferentes fuentes. En la práctica de la presente invención, las células madre pluripotentes humanas estarán presentes en un recipiente adecuado para el cultivo de células madre pluripotentes humanas en condiciones convencionales.

Las células madre pluripotentes humanas se ponen en contacto con XAV-939 y el segundo compuesto presente en un medio acuoso. El experto en la materia entenderá que se puede usar cualquier tipo de medio adecuado para mantener y/o cultivar las células madre pluripotentes humanas, aunque, de acuerdo con la invención, algunos medios son más preferidos (como se divulga en el presente documento).

El término medio acuoso se refiere a una composición a base de agua o a una composición en la que el disolvente es agua. Por ejemplo, se puede obtener un medio acuoso disolviendo (cualquier) sustancia (s) solubles en agua en agua. Preferiblemente, el medio está compuesto por compuestos y nutrientes que apoyan el crecimiento de las células madre pluripotentes humanas.

Para el método de la invención no es crítico si XAV-939 y el segundo compuesto se proporcionan a las células simultáneamente o por separado, es decir, como una combinación o añadidos al medio uno a la vez. Tampoco es crítico si la combinación ya está presente en el medio que se proporciona a la célula o si se agrega más tarde, cuando la célula ya está en el medio acuoso.

La molécula pequeña XAV-939, también conocida como 3,5,7,8-tetrahidro-2- [4- (trifluorometil) fenil] -4H-tiopirano [4,3-d] pirimidin-4-ona es descrito por Huang et al., Nature. 2009 1 de octubre; 461 (7264): 614-20. XAV-939 es un inhibidor de la transcripción mediada por beta-catenina. XAV939 estimula la degradación de la beta-catenina estabilizando la axina, el componente limitante de la concentración del complejo de destrucción. XAV939 estabiliza la axina inhibiendo las enzimas poli-ADP-ribosilantes tanquirasa 1 y tanquirasa 2. El XAV-939 puede obtenerse de diversas fuentes comerciales.

La molécula pequeña C59, o Wnt-C59, 2- [4- (2-metilpiridin-4-il) fenil] -N- (4-piridin-3-ilfenil) acetamida, se divulgó por primera vez en la patente WO2010101849, y es un inhibidor de PORCN (Porcupine) con IC50 de 74 pM. C59 previene la palmitilación de las proteínas Wnt por el puercoespín (una oaciltransferasa unida a la membrana). C59 puede obtenerse de diversas fuentes comerciales.

IWP-L6 (No. CAS: 1427782-89-5), 2 - [(4-oxo-3-fenil-6,7-dihidrotieno [3,2-d] pirimidin-2-il) sulfanil] - N- (5-fenilpiridin-2-il) acetamida, se describe en el documento WO 2014186450, por ejemplo, en la Figura 3, compuesto 27. Se encontró que IWP-L6 suprime la fosforilación de 2 desaliñado (Dvl2) en células HEK293.

5 En una realización, se proporcionan los métodos, el uso, los kits y el producto de la invención en los que se usa una combinación de un inhibidor de tanquirasa y un inhibidor de puercoespín, ejemplificado por la combinación de XAV-939 y el segundo compuesto (IWP- L6 y/o C59). La combinación puede usarse en métodos para lograr los objetos descritos en este documento, por ejemplo, para inducir o estimular la diferenciación de células madre pluripotentes humanas en una población de cardiomiocitos, preferiblemente cardiomiocitos ventriculares. Tales combinaciones pueden tener cualquiera de las ventajas divulgadas en este documento. En una realización preferida, se encuentra el segundo compuesto que suprime la fosforilación de dishevelled 2 (Dvl2), en humanos está codificado por el gen DVL2.

10 En algunas realizaciones preferidas, el método divulgado en el presente documento comprende además una etapa a, que se realiza antes de la etapa b), y en el que en la etapa a) la población de células madre pluripotentes humanas se pone en contacto con al menos un agonista de señalización de Wnt en un medio acuoso.

15 En estas realizaciones, las células madre pluripotentes humanas se ponen en contacto antes de la etapa b) con una cantidad de al menos un agonista de señalización de Wnt en una concentración que puede ser eficaz para inducir o promover la diferenciación de las células madre pluripotentes humanas en o hacia una población de cardiomiocitos humanos derivados de células madre, en particular en combinación con la etapa b). La etapa a) hace que las células madre pluripotentes humanas se diferencien en una población de células progenitoras mesodérmicas que, con el método de la invención, son capaces de diferenciarse en cardiomiocitos. En otras palabras, la concentración del agonista de señalización de Wnt en la etapa a) promueve además la diferenciación de las células madre pluripotentes humanas en el método de la invención, que comprende la etapa b). El experto en la materia entenderá que dicha concentración del agonista de Wnt que se utilizará en la etapa a) puede, en vista de la divulgación actual, determinarse utilizando técnicas convencionales.

20 En alguna realización, el agonista de señalización de Wnt puede combinarse con factores de crecimiento, que incluyen, por ejemplo, activina (por ejemplo, activina A), proteína morfológica ósea (por ejemplo, BMP-2 o BMP4) y/o combinaciones de las mismas.

25 En el que en la solicitud se hace referencia a al menos un agonista de señalización de Wnt, en realizaciones alternativas, se usa una combinación de activina y una proteína morfológica ósea, preferiblemente BMP-4 y/o BMP-2 en lugar de o además del agonista de señalización Wnt.

30 Las células madre pluripotentes humanas se ponen en contacto con el agonista de Wnt en un medio acuoso. El experto en la materia entenderá que se puede usar cualquier tipo de medio adecuado para mantener y/o cultivar las células madre pluripotentes humanas, aunque, de acuerdo con la invención, algunos medios son más preferidos (como se divulga en el presente documento). El medio es preferiblemente idéntico al medio usado en la etapa b) excepto por al menos un agonista de señalización de Wnt y la combinación de Xav-939/segundo compuesto.

35 Para el método de la invención no es crítico si el agonista de señalización de Wnt ya está presente en el medio que se proporciona a la célula o si se añade posteriormente, cuando la célula ya se encuentra en el medio acuoso.

40 Un agonista de señalización de Wnt puede ser cualquier molécula que dé como resultado un aumento de la producción de la vía de señalización de Wnt, por ejemplo, estabilizando, mejorando la expresión o mejorando la función de los componentes reguladores positivos de la vía o desestabilizando, disminuyendo la expresión de, o inhibiendo la función de componentes reguladores negativos de la vía. En particular, se ha demostrado que GSK-3 fosforila la beta-catenina, dirigiéndola así a su degradación. Por ejemplo, un agonista de señalización de Wnt puede inhibir GSK-beta, permitiendo así que aumenten los niveles nucleares de beta-catenina. Por ejemplo, el agonista de señalización de Wnt es un inhibidor de GSK-3 β , como TWS119, BIO, CHIR-99021, SB 216763, SB 415286, CP21R7, CHIR-98014 y similares.

45 TWS119: 3- (6- (3-aminofenil) -7H-pirrolo [2,3-d] pirimidin-4-iloxi) fenol es descrito por Ding et. al, Proc Natl Acad Sci USA. 24 de junio de 2003; 100 (13): 7632-7.

50 BIO: 6-bromo-3 - [(3E) -1,3-dihidro-3- (hidroxiimino) -2H-indol-2-iliden] -1,3-dihidro- (3Z) -2H-indol -2-ona o (2'Z, 3'E) -6-bromoindirrubin-3'-oxima es descrito por Meijer et. al, Chem Biol. Diciembre de 2003; 10 (12): 1255,66.

55 CHIR-99021: 6 - [[2 - [[4- (2,4-diclorofenil) -5- (5-metil-1H-imidazol-2-il) -2-pirimidinil] amino] etil] amino] -3-piridincarbonitrilo está descrito por Bennett et al., J Biol Chem. 2002 23 de agosto: 277 (34): 30998-1004.

60 SB 216763: La 3- (2,4-diclorofenil) -4- (1-metil-1H-indol-3-il) -1H-pirrol-2,5-diona está descrita por Cross et al., J Neurochem. Abril de 2001; 77 (1): 94-102.

65 SB 415286: La 3- (3-cloro-4-hidroxifenilamino) -4- (2-nitrofenil) -1H-pirrol-2,5-diona está descrita por Cross et al., J Neurochem. Abril de 2001; 77 (1): 94-102.

CP21R7: (3- (3-Amino-fenil) -4- (1-metil-1H-indol-3-yl) -pirrol-2,5-diona (CP21R7, descrito por Gong et al; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 20 (2010), 1693-1696; también se describe en detalle en EP2718425).

5 CHIR-98014: N2- (2- (4- (2,4-diclorofenil) -5- (1H-imidazol-1-il) pirimidin-2-ilamino) etil) -5 nitropiridina-2,6- la diamina es descrita por Ring et al., Diabetes. Marzo de 2003; 52 (3): 588-95.

10 La dosis eficaz de un agonista de Wnt puede ser de al menos aproximadamente 0.1 microM. al menos aproximadamente 1 microM, al menos aproximadamente 2.5 microM, al menos aproximadamente 5 microM, y normalmente no más de aproximadamente 500 microM, no más de aproximadamente 250 microM, no más de aproximadamente 100 microM, no más de aproximadamente 50 microM. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz es de aproximadamente 5 microM.

15 Preferiblemente, CHIR-99021 se usa en el método de la invención, preferiblemente es una concentración de 0.1 microM - 50 microM, más preferiblemente en una concentración de 0.5 - 20 microM, incluso más preferible en una concentración de 0.5 microM - 10 microM; en una realización particularmente preferida, CHIR-99021 se usa en una concentración de 4 a 7 microM.

20 En algunas realizaciones preferidas, se usa CHIR-99021 como la etapa a) del agonista de señalización de Wnt y se usa XAV-939 e IWP-L6 en la etapa b).

25 En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto la población de células madre pluripotentes humanas con IGF, preferiblemente IGF de largo alcance en un medio acuoso. Se encontró sorprendentemente que la adición de IGF al medio acuoso puede mejorar el rendimiento de células de cardiomiocitos, en comparación con el mismo método y en el que se empleó IGF.

30 El factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), como se usa en este documento, comprende tanto IGF-1 como IGF-2, que son miembros bien conocidos de la superfamilia de hormonas, factores de crecimiento y neuropéptidos de la insulina. El eje del factor de crecimiento similar a la insulina y la hormona del crecimiento (GH) cumple una función importante en la regulación del crecimiento somático fetal e infantil. El factor de crecimiento similar a la insulina I también se conoce como somatomedina C.

35 El IGF-1 es una hormona de estructura molecular similar a la insulina. Desempeña un papel importante en el crecimiento infantil y continúa teniendo efectos anabólicos en los adultos. Un análogo sintético de IGF-1, mecasermina, se usa para el tratamiento del retraso del crecimiento. El papel principal del IGF-2 es como una hormona promotora del crecimiento durante la gestación. El factor de crecimiento tiene una dependencia importante, pero no absoluta, de la somatotropina.

40 También están comprendidos por el término análogos recombinantes del factor de crecimiento similar a la insulina, por ejemplo, análogos recombinantes del factor de crecimiento similar a la insulina humana, tales como IGF-1 de largo alcance, es decir, un IGF-1 recombinante con potencia aumentada y/o Durabilidad para usar durante el cultivo. Un ejemplo es LONG® R3 IGF-I, que es un análogo recombinante del factor de crecimiento I similar a la insulina humana (IGF-I) que ha sido diseñado específicamente para mejorar el rendimiento del cultivo celular. Es biológicamente más potente in vitro que la insulina o el IGF-1 nativo y se ha demostrado que aumenta significativamente la producción de proteínas recombinantes. Es ideal para sistemas de cultivo que utilizan aplicaciones de suero sin suero o de bajo nivel (ver, por ejemplo, Hussain Dahodwala et. Al Cytotechnology, 64 (1), 27-41 (2012) y US5330971, US5164370 y EP429586; obtenible de repligen www.repligen.com/cell-culture-growth-factors/long-r3igf-i)/PCT

45 Puede añadirse IGF durante cualquier etapa del método de diferenciación de la población de células madre pluripotentes humanas. El IGF se puede proporcionar, por ejemplo, a la población de células madre pluripotentes humanas inmediatamente después de sembrar o pasar las células (es decir, después de transferir una pequeña cantidad de células a un nuevo recipiente para cultivar) y antes, por ejemplo, de que se realice la etapa a) (el contacto de las células con al menos el agonista de señalización de Wnt), o antes de que se realice la etapa b) (el contacto de las células con XAV-939 e IWP-L6 y/o C-59). Sin embargo, se descubrió sorprendentemente que también se puede proporcionar IGF a las células durante la etapa a) o la etapa b), es decir, simultáneamente con el contacto de las células con al menos el agonista de señalización de Wnt o con XAV-939 e IWP-L6 y/o C-59. La presencia de IGF durante la etapa a) o b) sorprendentemente no influyó negativamente en la diferenciación de las células madre pluripotentes humanas en una población de células de cardiomiocitos (es decir, la velocidad o el progreso de la diferenciación), mientras que sí mejora la cantidad total de células que se pueden adquirir. Por tanto, se encontró sorprendentemente que el IGF no interacciona negativamente con los compuestos usados en el método de la invención para inducir o promover la diferenciación de las células madre pluripotentes humanas (incluida, por ejemplo, insulina, cuando se usa en cualquier etapa). También se puede proporcionar IGF a las células madre pluripotentes humanas después de realizar la etapa b), es decir, después de que las células se hayan puesto en contacto con XAV-939 e IWP-L6 y/o C-59. El IGF puede estar presente durante cualquier etapa o paso del método de diferenciación de la población de células madre pluripotentes humanas.

60 El medio acuoso usado puede ser cualquier medio adecuado para mantener o diferenciar las células madre pluripotentes humanas con el método divulgado en este documento.

El suministro de IGF a las células madre pluripotentes humanas en una concentración adecuada puede realizarse usando técnicas convencionales y puede incluir refrescar el medio durante el cultivo.

5 En algunas realizaciones, cuando se usa IGF, incluido IGF de largo alcance, el medio acuoso en el que está presente el IGF no comprende insulina, ni insulina ni transferrina, ni insulina, ni transferrina ni selenio. En otra realización, en el método de la invención no se usa insulina, ni insulina y transferrina, o no se usa insulina y transferrina ni selenio en el método de la invención cuando se usa IGF.

10 La insulina, transferrina y 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 insulina-transferrina-selenio etanolamina de Gibco (ITS-X) (catálogo No. 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.

15 En algunas realizaciones, el método de la invención comprende además una etapa c) de poner en contacto, después de la etapa b), la población de células madre pluripotentes humanas con un medio acuoso que no comprende XAV-939, dicho segundo compuesto, y/o dicho Agonista de señalización de Wnt, preferiblemente en el que el medio acuoso comprende IGF. Se encontró que no es necesario contactar las células madre pluripotentes humanas en la etapa b) con la combinación de XAV-939 y el segundo compuesto (C59 y/o IWP-L6), durante todo el período las células se diferencian
20 en una población de cardiomiocitos derivados de células madre.

De hecho, cultivar las células en ausencia de tal combinación, después de un cierto período de tratamiento con tal combinación en la etapa b) (por ejemplo, usando períodos de contacto como se describe a continuación), dio poblaciones de cardiomiocitos homogéneas con alto rendimiento, en particular cuando en el método de la invención las células también
25 se pusieron en contacto con IGF, por ejemplo, cuando las células se pusieron en contacto con IGF después de la etapa b) y en el medio que está desprovisto de otros compuestos destinados a inducir o promover la diferenciación de células madre pluripotentes humanas, tales como un agonista de señalización de Wnt y/o un antagonista de señalización de Wnt. El medio acuoso utilizado puede ser cualquier medio adecuado para mantener y/o diferenciar las células madre pluripotentes humanas con el método divulgado en este documento y proporcionar dicho medio y el cultivo de las células
30 puede ser realizado por un experto en la técnica utilizando técnicas convencionales, que incluyen, por ejemplo, cultivar a temperaturas admisibles y, si se desea, refresco de los medios.

El segundo compuesto usado en el método de la invención puede ser IWP-L6 y/o C59. Sin embargo, en una realización preferida, el compuesto que se combina con XAV-939 es IWP-L6. Se encontró que IWP-L6, cuando se combina con XAV-
35 939, permite una mejor diferenciación de la población de células madre pluripotentes humanas en una población de células de cardiomiocitos, preferiblemente una población de células de cardiomiocitos ventriculares. En relación con IWP-L6, se observó que las concentraciones de C59 empleadas en la combinación con XAV-939 proporcionaban un rendimiento reducido de células obtenidas con el método de la invención (datos no mostrados). En otras palabras, en relación con IWP-L6, C59 parece, en combinación con XAV-939, más tóxico para las células madre pluripotentes humanas. Además,
40 se descubrió sorprendentemente que la concentración de IWP-L6 puede ser considerablemente más baja (más), lo que hace que IWP-L6 sea particularmente útil en el método de la invención, ya que la concentración baja puede reducir los efectos secundarios no deseados y específicos. Por tanto, en una realización preferida, el segundo compuesto en combinación con XAV-939 es IWP-L6. Se encontró sorprendentemente que la combinación de XAV-939 e IWP-L6 es una combinación eficaz para inducir o promover la diferenciación de la población de células madre pluripotentes humanas en
45 una población de células de cardiomiocitos, preferiblemente una población de células de cardiomiocitos ventriculares, en comparación con otra combinación de este tipo.

Además, se encontró el efecto beneficioso de la combinación específica de XAV-939 e IWP-L6 para todas las diferentes fuentes de células madre pluripotentes humanas probadas y, por tanto, parece independiente de las estirpes celulares
50 utilizadas en el método de la invención.

Además, y lo que es más importante, se encontró sorprendentemente que las ventajas del método de la invención, que comprende el uso de la combinación de XAV-939 y el segundo compuesto, preferiblemente IWP-L6, también son independientes del método utilizado, (antes de realizar la etapa b), o, cuando se realiza la etapa a), la etapa a)) para
55 mantener las células madre pluripotentes humanas en el estado indiferenciado (por ejemplo, utilizando métodos de mantenimiento probados como E8, alimentadores, mTeSR y L7, ver ejemplos), y por lo tanto parece independiente de la fuente. En la práctica, antes de que las células se sometan a diferenciación, las células madre pluripotentes humanas, por ejemplo, tras la etapa de las células o la siembra de las células, se cultivan en un medio de mantenimiento, manteniendo sustancialmente las células madre pluripotentes humanas en un estado indiferenciado. Se encontró
60 sorprendentemente que el método utilizado para el mantenimiento de las células antes de inducir la diferenciación con el método de la invención puede ser cualquier método adecuado, demostrando además la solidez y aplicabilidad general del método de la invención. De hecho, los inventores actuales observaron que el período de mantenimiento (es decir, el período de cultivo de células madre pluripotentes humanas indiferenciadas en un medio), puede reducirse en el tiempo en comparación con el mismo método de diferenciación y donde no se usa la combinación de XAV-939 y el segundo
65 compuesto preferiblemente IWP-L6.

- Un ejemplo de un medio adecuado para el mantenimiento de las células sería DMEM/F12 (Gibco, cat. No. 11320-033), 1-30 %, preferiblemente 15-25, más preferiblemente aproximadamente 20 % (v/v) de suero de remplazo knockout (por ejemplo, Gibco, cat. No. 10828-028), 0.01 - 1, mM, preferiblemente 0.05 – 0.5 mM, más preferiblemente aproximadamente 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (por ejemplo, 1x Gibco, cat. No. 11140-050), 0.1 - 10 mM, preferiblemente 0.5 - 5 mM, más preferiblemente aproximadamente 2 mM de L-glutamina (por ejemplo, Gibco, cat. No. 25030-081), opcionalmente 2b-mercaptoetanol (por ejemplo, No. de catálogo 21985-023), y 0-40, preferiblemente 1-20, más preferiblemente aproximadamente 10 ng/ml de bFGF humano (factor de crecimiento de fibroblastos básico). Pero, como se desprende de lo anterior, se puede utilizar inicialmente cualquier medio adecuado.
- En algunas realizaciones preferidas, el medio utilizado como medio para la diferenciación en el método (es decir, utilizado como medio base en la etapa a), b) y/o c), y posiblemente d)) está esencialmente libre de suero, y preferiblemente el medio comprende lípidos y uno o más oligoelementos, y opcionalmente insulina, transferrina y selenio.
- En una realización preferida en los métodos de la invención para la obtención de cardiomiocitos, en particular cardiomiocitos ventriculares, el medio en la etapa b) no comprende vitamina A y/o derivados de la misma (por ejemplo, ácido retinoico, retinol, retinal, carotenoides provitamina A, y similares).
- En una realización preferida adicional en los métodos de la invención para obtener cardiomiocitos, en particular cardiomiocitos ventriculares, el medio en las etapas a), b) y/o c) no comprende vitamina A y/o derivados de la misma (por ejemplo, ácido retinoico, retinol, retinal, carotenoides provitamina A y similares). En estas realizaciones, también la etapa d) (si se realiza) se puede realizar con o sin vitamina A y/o derivados de la misma (por ejemplo, ácido retinoico, retinol, retinal, provitamina A y similares).
- Dentro del contexto de la presente invención, un medio está esencialmente libre de suero cuando el porcentaje de suero es menos del 1 % p/p, preferiblemente menos del 0.5 % p/p, incluso más preferiblemente menos del 0.1 % p/p, incluso más preferiblemente menos del 0.05 % p/p del medio listo para usar, lo más preferiblemente el medio está libre de suero (es decir, 0 % p/p de suero). Por definición, los medios esencialmente libres de suero carecen esencialmente de suero completo como ingrediente, pero puede que no estén completamente libres 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 tales medios sin suero. Por ejemplo, puede comprender hasta un 10 % en peso, preferiblemente hasta un 5 % en peso, incluso más preferiblemente hasta un 2 % en peso, hasta un 1 % en peso, hasta un 0.5 % en peso, o lo más preferiblemente hasta un 0.25 % en peso de albúmina, por ejemplo, Bovostar BSA de Bovogen (Williams Ave Keilor East VIC 3033, Australia). Un medio esencialmente libre de suero puede ser, en el contexto de la presente invención, un medio definido. Preferiblemente, el medio usado en el método de la invención es un medio definido.
- El experto entenderá que, en diferentes etapas del método, por ejemplo, los medios utilizados en la etapa a), etapa b) y/o etapa c), o la etapa anterior o posterior a dichas etapas pueden o no estar esencialmente libre de suero. Por ejemplo, las células pueden o no estar inicialmente en placa en un medio que comprende suero.
- En una realización preferida, se usa un medio definido en una o más, preferiblemente en todas las etapas del método de la invención. Dichos medios definidos pueden ser cualquier medio adecuado para el mantenimiento de las células madre pluripotentes humanas, por ejemplo, cualquier medio adecuado para cultivar las células madre pluripotentes humanas.
- Los medios de cultivo sin suero químicamente definidos son bien conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. El experto en la técnica sabe cómo seleccionar un medio de cultivo sin suero apropiado (definido químicamente) para la preparación de las composiciones de medios de cultivo de la invención. Los ejemplos no limitantes de medios de cultivo basal libres de suero disponibles comercialmente y (químicamente definidos) incluyen, mezcla de nutrientes F-12 (Ham), mezcla de nutrientes F-10, Leibovitz L-15, McCoy 5A, MCDB 131, G-MEM, MEM mejorado, DMEM, DMEM/F12, RPMI-1640, Waymouth's MB 752/1, Williams' Media E, IMDM, Media 199, Opti-MEM, Modified Eagle Media (MEM), Minimal Essential Media (MEM), BGJb (Modificación Fitton-Jackson), CMRL, BME. Puede emplearse una mezcla de uno o más medios sin suero químicamente especificados en las composiciones de medios de cultivo de la presente invención. Un ejemplo no limitante de una mezcla de dos medios de cultivo sin suero químicamente especificados es, por ejemplo, una mezcla que comprende IMDM y nutriente F12 (Ham). Se demostró que dicha mezcla es particularmente adecuada para la preparación de las composiciones de medios de cultivo de la presente invención.
- Por ejemplo, en la presente invención, la composición de medio de diferenciación básica adecuada para diferenciar células madre pluripotentes humanas indiferenciadas en cardiomiocitos es una composición de medio libre de suero, que comprende un medio basal, albúmina (recombinante) y opcionalmente ácido ascórbico (por ejemplo, de 20 a 70 microgramos por ml/por ejemplo aproximadamente 50 microgramos por ml), y puede comprender además una mezcla de lípidos, insulina, transferrina y selenio, y uno o más oligoelementos (por ejemplo, uno o más elementos, 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).
- Por ejemplo, el medio de diferenciación contiene 40 - 50 %, por ejemplo, 46.5 % IMDM (Gibco 21056), 0 - 1 %, por ejemplo, 0.25 % Bovostar BSA, 40 - 50 %, por ejemplo, 46.5 % Ham's F12 con Glutamax., 0.1 - 4 mM, por ejemplo, 2 mM Glutamax, 350 - 550 nM, por ejemplo, 450 nM alphaMTG, 0 – 0.2 mg/ml, por ejemplo, 0.05 mg/ml de ácido ascórbico, 0 - 1 %, por

ejemplo, 0.5 % 5000 U/ml Pen/Strep (Gibco 12070), 0.005 – 0.02, por ejemplo, 0.01 % 1000 * Mezcla de oligoelementos B (Cellgro 99-176-CL), 0.005 – 0.02, por ejemplo, 0.1 % 1000 * Mezcla de oligoelementos C (Cellgro 99 -176-CL).

5 Los medios de diferenciación pueden comprender además una mezcla de lípidos. La mezcla de lípidos puede comprender colesterol (por ejemplo, aproximadamente 1 microgramo/ml a aproximadamente 4 microgramos/ml) y uno o más lípidos seleccionados entre ácido linolénico, ácido linoleico y ácido palmítico (por ejemplo, 0.001 - 1 microgramo/ml de cualquier lípido, preferiblemente 0.01 - 1 microgramos/ml, incluso más preferiblemente 0.05 - 2 microgramos/ml, por ejemplo, aproximadamente 0.1 microgramos/ml de ácido linoleico y/o ácido linolénico y/o ácido palmítico) y opcionalmente ácido araquidónico, DL-alfa-tocoferol acetato, alcohol etílico, ácido mirístico, ácido oleico, ácido palmitoleico, pluronic F-68, ácido esteárico y tween 80. Por ejemplo, 0.05 - 2 %, por ejemplo, 1 % (p/p o vol/vol) 100 * Lípidos químicamente definidos (Gibco 11905).

15 El medio de diferenciación puede comprender además aproximadamente 0.05 - 3, preferiblemente 0.1 - 2, incluso más preferiblemente aproximadamente 0.5 – 1.5 mg/l, y/o aproximadamente 0.01 - 2 mg/l, preferiblemente aproximadamente 0.1 - 1 mg/l, incluso más preferiblemente aproximadamente 0.25 – 0.75 mg/l de transferrina y/o aproximadamente 0.0001 – 0.01 mg/l, preferiblemente aproximadamente 0.0004 – 0.0008 mg/l, por ejemplo, aproximadamente 0.0005 – 0.0007 mg/l de selenio y/o aproximadamente 0.1 mg/l a aproximadamente 5 mg/l de insulina, preferiblemente de aproximadamente 0.3 mg/l a aproximadamente 4 mg/l de insulina, preferiblemente de aproximadamente 0.5 mg/l a aproximadamente 3 mg/l de insulina, preferiblemente de aproximadamente 0.7 mg/l a aproximadamente 2 mg/l de insulina, preferiblemente de aproximadamente 0.9 mg/l a aproximadamente 1.2 mg/l de insulina, preferiblemente de aproximadamente 0.95 mg/l a aproximadamente 1.05 mg/l de insulina, más preferiblemente de aproximadamente 1 mg/l de insulina. Por ejemplo, 0.1 % 100 * ITS-X (Gibco 51500).

25 El medio de diferenciación puede comprender además poli(alcohol vinílico) (PVA), típicamente en concentraciones de aproximadamente 0.012 – 0.5 % en peso, preferiblemente aproximadamente 0.05 – 0.2 % en peso, por ejemplo, aproximadamente 0.125 % en peso (también cualquier medio usado para madurar las células puede comprender tales cantidades de PVA).

30 En las realizaciones en las que se usa IGF en el método de la invención, el medio usado puede o no comprender cualquier insulina, o cualquier insulina y cualquier transferrina, o cualquier insulina y cualquier transferrina o cualquier selenio, como ya se discutió anteriormente, ya sea en los medios que comprenden IGF o en cualquier medio usado en el método de la invención.

35 Los medios descritos anteriormente son medios particularmente adecuados para cultivar las células madre pluripotentes humanas durante la etapa a), b) y c) del método de la invención.

40 El experto en la materia puede emplear técnicas convencionales para proporcionar a las células madre pluripotentes humanas un medio adecuado y en condiciones que permitan el mantenimiento y crecimiento de las células madre pluripotentes humanas en el medio.

45 El experto entenderá que el período durante el cual la población de células pluripotentes humanas se pone en contacto durante las diversas etapas del método de la invención debe ser de longitud suficiente para permitir que las células, en el método de la invención, se diferencien en una población de células de cardiomiocitos, preferiblemente una población de células de cardiomiocitos ventriculares. El experto en la materia puede, utilizando técnicas convencionales, establecer tales períodos adecuados.

50 Sin embargo, en algunas realizaciones, y en la que la etapa a) se realiza, preferiblemente la etapa b) se inicia al menos 1 y hasta 7 días después del inicio de la etapa a) y/o en la que dicha etapa b) concluye dentro de los 35 días, preferiblemente dentro de los 14 días, más preferiblemente dentro de los 5 días, incluso más preferiblemente dentro de los 3 días, lo más preferiblemente dentro de los 2 días posteriores a su inicio. Preferiblemente, la etapa b) se realiza al menos durante dos días. En una realización, la etapa a) se realiza durante 2 días y la etapa a) se realiza durante 2 días.

55 Se encontró sorprendentemente que el empleo de tales longitudes para el período de la etapa a) y de la etapa b), en particular cuando la combinación empleada en la etapa b) es XAV-939 e IWP-L6, da una población de células bien diferenciada.

60 El experto en la materia comprenderá que, dentro del contexto de la presente invención, el contacto en la etapa a) y la etapa b) no se realizan de forma simultánea o superpuesta. La etapa b) siguiente se realiza después de que se haya realizado la etapa a). Esto evita que XAV-939 y el segundo compuesto empleado en la etapa b) estén presentes al mismo tiempo que el compuesto de señalización de Wnt en la etapa a). El experto en la materia comprenderá que entre la etapa a) y la etapa b) puede haber un breve período de cultivo de las células antes de iniciar la etapa b). Sin embargo, se prefiere que dicho período no sea superior a 3 días, preferiblemente no superior a 1 día, lo más preferiblemente ausente.

65 Por tanto, en alguna realización, la etapa a) se realiza durante al menos 1 día, preferiblemente 1 - 7 días, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la etapa b) se realiza durante al menos 1 día, preferiblemente 1 a 35 días, por ejemplo, 1 a 14 días, 1 a 5 días o 1 a 2 días, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5., ... 35 días.

5 En realizaciones en las que la etapa a) no se realiza (es decir, en las que las células madre pluripotentes humanas no se ponen en contacto con un agonista de señalización de Wnt antes de que las células se pongan en contacto con la combinación de XAV-939 y el segundo compuesto (C59 y/o IWP-L6), la etapa b) se realiza durante al menos 1 día, preferiblemente 1 a 35 días, por ejemplo, 1 a 14 días, 1 a 5 días o 1 a 2 días, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, ... 35 días.

10 En algunas realizaciones preferidas, y en las que se realiza la etapa c), la etapa c) se concluye dentro de los 35 días, preferiblemente dentro de los 28 días, más preferiblemente dentro de los 21 días, incluso más preferiblemente dentro de los 14 días, más preferiblemente dentro de los 10 días posteriores a su inicio. Se encontró que con el método de la invención, se puede reducir el tiempo requerido para obtener una población de cardiomiocitos. Preferiblemente, el período de la etapa c) es de al menos 1 día, por ejemplo, entre 1 y 35 días, preferiblemente entre 1 y 14 días, por ejemplo, 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días.

15 En algunas realizaciones, el período de cultivo de las células con el método de la invención (hasta el final de la etapa b) o la etapa c)) es de 21 días, por ejemplo, entre 5 y 21 días, preferiblemente entre 7 y 15 días, por ejemplo, 12-14 días.

20 El experto entenderá que la concentración de los diversos compuestos usados en el método de la invención puede variar, dependiendo, por ejemplo, de la fuente de célula madre pluripotente humana usada y/o las condiciones específicas usadas para cultivar las células. El experto en la materia puede, utilizando técnicas convencionales, establecer dicha concentración adecuada.

25 Sin embargo, una de las ventajas del método de la invención es que se pueden usar concentraciones de compuestos para inducir y/o promover la diferenciación de las células madre pluripotentes humanas que no presentan una eficacia y, en particular en la combinación, no exhiben efectos negativos sobre la diferenciación o el rendimiento de las células (por ejemplo, actuando a-específicamente de varios objetivos (enzimas/proteínas y similares) en la célula).

30 Por tanto, en realizaciones ventajosas del método de la invención, la concentración de XAV-939 es de 0.1 a 20 microM en el medio acuoso.

35 Por tanto, en realizaciones ventajosas del método de la invención, la concentración C-59 es 0.05-0.50 microM en el medio acuoso.

40 Por tanto, en realizaciones ventajosas del método de la invención, la concentración de IWP-L6 es 0.01 - 15 microM en el medio acuoso.

45 Por tanto, en realizaciones ventajosas del método de la invención, la concentración de IGF es 0.01 - 10 ng/ml en el medio acuoso. En algunas realizaciones, en las que el IGF está presente en el medio acuoso, el medio acuoso o cualquier otro medio acuoso usado en el método no comprende insulina o insulina y transferrina o insulina y transferrina y selenio.

50 Preferiblemente, y cuando el compuesto se emplea en el método de la invención, la concentración de XAV-939 es de 0.1 a 20 microM en el medio acuoso, la concentración de C-59 es de 0.05 a 0.50 microM en el medio acuoso, la concentración IWP-L6 es de 0.01 a 15 microM en el medio acuoso y la concentración de IGF es de 0.01 a 10 ng/ml en el medio acuoso.

55 El suministro de los compuestos a las células madre pluripotentes humanas en una concentración adecuada puede realizarse usando técnicas convencionales y puede incluir refrescar el medio durante el cultivo.

Independientemente de la concentración usada, sorprendentemente se encontró que, cuando el segundo compuesto es IWP-L6, la ración entre XAV-939 e IWP-L6 usada en la combinación de compuestos en la etapa b) es preferiblemente (XAV-939 : IWP-L6) entre 1: 1 y 1:0.001, más preferentemente entre 1:0.1 y 1:0.01, incluso más preferentemente entre 1:0.2 y 1:0.8, incluso más preferentemente aproximadamente 1:0.05. Se encontró que las proporciones más preferidas de XAV-939: IWP-L6 dan poblaciones homogéneas de cardiomiocitos (por ejemplo, una gran parte del tallo pluripotente humano muestra, después de cultivar con el método de la invención, características de cardiomiocitos (maduros o inmaduros), preferiblemente cardiomiocitos ventriculares, mientras que al mismo tiempo las células se proporcionan con alto rendimiento, lo que hace que el método de la invención sea robusto, altamente repetible y, como se mencionó anteriormente, utilizable para todo tipo de fuentes de las células madre pluripotentes humanas empleadas.

60 En una realización particularmente preferida del método de la invención, la concentración de XAV-939 con la que se pone en contacto la población de células madre pluripotentes humanas en la etapa b) es una concentración, cuyo aumento no estimulará más la diferenciación de la población de células madre pluripotentes humanas en ausencia del segundo compuesto. En esta realización, la concentración de XAV-939 usada en el método de la invención es una concentración que cuando la concentración del mismo aumentaría y se usaría solo en el método de la invención (es decir, no en combinación con el segundo compuesto, en particular IWP -L6), no estimularía más la diferenciación de la población de células madre pluripotentes humanas en cardiomiocitos, preferiblemente cardiomiocitos ventriculares y, por ejemplo, una medida basada en un marcador de cardiomiocitos como se discute en el presente documento. Por ejemplo, si el aumento de una cierta concentración X a una concentración X + Y no aumenta más, en condiciones similares, la diferenciación de las células madre pluripotentes humanas en cardiomiocitos (y en ausencia del segundo compuesto (C59/IWP-L6), medido

por el número de, por ejemplo, células positivas para TNNT2 o células positivas para NKX2.5, esa concentración X de XAV-939 es una concentración cuyo aumento no estimulará más la diferenciación de la población de células madre pluripotentes humanas en ausencia del segundo compuesto.

5 Se encontró sorprendentemente que en condiciones en las que el aumento de la concentración de XAV-939 no estimula y/o induce más la diferenciación de la célula madre pluripotente humana en cardiomiocitos, la adición del segundo compuesto a XAV-939, en particular IWP-L6 podría estimular además la diferenciación de las células y, por ejemplo, al menos sin influir negativamente en el rendimiento y/o las características de los cardiomiocitos así obtenidos.

10 Como ya se discutió anteriormente, el método in vitro de la invención se puede emplear usando todo tipo de fuentes de células madre pluripotentes humanas. Preferiblemente, la población de células madre pluripotentes humanas es una población de células madre embrionarias o una población de células madre pluripotentes inducidas. Esto puede incluir estirpes celulares establecidas.

15 En algunas realizaciones, las células madre pluripotentes humanas se cultivan antes de la etapa a) en un medio de mantenimiento de células madre, por ejemplo, en el medio de diferenciación básico como se describió anteriormente. En aquellas realizaciones en las que no se realiza la etapa a), las células madre pluripotentes humanas pueden cultivarse antes de la etapa b) en un medio de mantenimiento de células madre, por ejemplo, en el medio de diferenciación básico como se describe anteriormente.

20 En algunas otras realizaciones, la población de cardiomiocitos obtenida de las células madre pluripotentes humanas, después de la etapa b) o, en el caso dado, la etapa c), se cultivan en una etapa d) en un medio acuoso para madurar la población celular de cardiomiocitos, preferiblemente en la que el medio acuoso comprende glucosa, lípidos, carnitina, creatina, taurina, opcionalmente análogos de hormona tiroidea (T3 o DITPA, ácido 3,5-diiodotiroproprónico) y
25 opcionalmente insulina, transferrina y selenio. Dichos medios se han descrito, por ejemplo, en detalle en el documento WO2014200339.

Por ejemplo, dicha composición comprende aproximadamente 25 ng/ml a aproximadamente 150 ng/ml de T3 y/o aproximadamente 1 microM a aproximadamente 2 microM de DITPA y/o comprende aproximadamente 1 microgramo/ml a aproximadamente 4 microgramos/ml de colesterol, uno o más lípidos seleccionados entre ácido linolénico, ácido linoleico y ácido palmítico (en las concentraciones divulgadas anteriormente) y/o aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 3.5 mM de carnitina y/o aproximadamente 3.0 mM a aproximadamente 7.0 mM de creatina, y/o aproximadamente 2 mM a aproximadamente 7 mM de taurina, y/o 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 y/o 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; y/o en la que la composición además comprende albúmina de suero bovino, glucosa, vitaminas, antibióticos, monotioglicerol, glutamina, aminoácidos y mezcla de nutrientes Ham's F12 (por ejemplo, Gibco 31765) y/o IMDM (por ejemplo, Gibco 21056). Por supuesto, también se pueden emplear otros medios adecuados para madurar más las células.

40 Preferiblemente, el método comprende antes de la etapa d) que las células se hayan recolectado y congelado y mantenido en un medio adecuado para almacenar células congeladas antes de volver a plaquear/pasar las células en el medio acuoso para la maduración en la etapa d). En una realización preferida, la etapa d) se realiza dentro de/durante un período de 21 días, por ejemplo, de 1 a 21 días, preferiblemente de 4 a 18 días, preferiblemente de 5 a 16 días.

45 En una realización preferida, el método de la invención, y en el que se realiza la etapa d), se concluye en un período de 50 días, preferiblemente 35 días, incluso más preferiblemente 30 días, incluso más preferiblemente 21 días. Por ejemplo, el método de la invención, y en el que se realiza la etapa d), lleva de 10 a 50 días, preferiblemente de 11 a 35 días, incluso más preferiblemente de 12 a 30 días, por ejemplo, de 14 a 21 días.

50 Sorprendentemente se encontró que al realizar la etapa d) usando un medio de maduración para los cardiomiocitos, es decir, y en el que dicho medio es diferente del medio usado antes o durante la etapa a) y/o la etapa b), y/o etapa c) se pueden obtener altos rendimientos de cardiomiocitos bien diferenciados y maduros, preferiblemente cardiomiocitos ventriculares.

55 En algunas realizaciones, el método de la invención comprende además la etapa de verificar la presencia de cardiomiocitos, preferiblemente cardiomiocitos ventriculares, después de la etapa b), etapa c) y/o d). Tal verificación puede implicar, para determinar un perfil electrofisiológico de cardiomiocitos; determinar la capacidad de respuesta a fármacos cardioactivos conocidos; o analizar la población celular para detectar la presencia o ausencia de proteínas o genes marcadores de cardiomiocitos específicos como TNNT2, Troponina T cardíaca, NKX2-5 (la proteína Homeobox Nkx-2.5 es una proteína que en humanos está codificada por el gen NKX2-5) y/o mlc2v (cadena ligera de miosina (MLC) 2v) utilizando técnicas convencionales.

60 Por ejemplo, la verificación de la presencia o madurez metabólica de cardiomiocitos, preferiblemente cardiomiocitos ventriculares, puede determinarse mediante métodos conocidos por el experto, por ejemplo, métodos que analizan el

fenotipo, morfología, expresión génica, marcadores metabólicos, marcadores de superficie celular, características electrofisiológicas y/o ensayo funcional celular de la célula.

5 Por ejemplo, para verificar la presencia de cardiomiocitos se puede determinar la expresión de genes asociados con un estado "fetal" o un estado de hipertrofia cardíaca como, por ejemplo, NPPA (BNA) y NPPB (BNP), o preferiblemente, determinar la características electrofisiológicas de los cardiomiocitos derivados de células madre en maduración, y en las que se puede ver una característica de cardiomiocitos más adulta o parecida a un adulto para cardiomiocitos derivados de células madre más maduros.

10 La verificación de la presencia o madurez de cardiomiocitos, preferiblemente cardiomiocitos ventriculares, también puede determinarse por la presencia o expresión de genes asociados con el estado fetal, tales como NPPA, NPPB, actina de músculo liso y actina esquelética, o la expresión de genes/proteínas de adultos, tales como la cadena ligera de miosina 2V, el receptor de calsequestrina y rianodina.

15 La verificación del fenotipo de los cardiomiocitos también puede determinarse por la presencia o expresión de genes asociados con un cierto subtipo, como MLC2v para cardiomiocitos ventriculares y MLC2A y sarcolipina para cardiomiocitos auriculares.

20 El experto en la materia sabe cómo evaluar la presencia o madurez de cardiomiocitos derivados de células madre en cultivo in vitro mediante el uso de marcadores específicos de cardiomiocitos conocidos, por ejemplo, marcadores específicos de cardiomiocitos ventriculares o marcadores específicos de linaje relevantes para una etapa de desarrollo particular, así como los métodos disponibles en la técnica (ver, por ejemplo, Burridge et al (2012), Stem Cell Cell, Vol.10 (1): 16-28, US2013/0029368).

25 Otra forma es evaluar las propiedades electrofisiológicas, por ejemplo, la capacidad de una célula para generar y/o propagar un potencial de acción in vitro. Las características electrofisiológicas de los cardiomiocitos, por ejemplo, los cardiomiocitos ventriculares, en cultivo in vitro pueden evaluarse, por ejemplo, mediante técnicas de pinzamiento de parche, entre otras técnicas, y pueden medir la velocidad máxima de ascenso, el potencial de membrana en reposo y la amplitud del potencial de acción, que son características distintivas de cardiomiocitos. Las características morfológicas de un cardiomiocito derivado de células madre, por ejemplo, cardiomiocitos ventriculares, en cultivo in vitro pueden evaluarse, por ejemplo, mediante técnicas de inmunohistoquímica (entre otras técnicas), por ejemplo, utilizando inmunofluorescencia (Cy3 o Alexa-Fluor 647) y anticuerpos dirigidos contra componentes integrales del citoesqueleto, por ejemplo, alfa-actinina.

35 En realizaciones preferidas del método de la invención, se determina que al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de las células son cardiomiocitos, preferiblemente cardiomiocitos ventriculares, usando técnicas convencionales.

40 También se proporcionan kits adecuados para realizar el método de la invención. Se proporciona un kit para diferenciar una población de células madre pluripotentes humanas en una población de células de cardiomiocitos, preferiblemente una población de células de cardiomiocitos ventriculares, el kit comprende

a)

- 45 – XAV939;
- un segundo compuesto, en el que el compuesto es IWP-L6 o C59;
- un medio acuoso; y
- 50 – opcionalmente IGF,

preferiblemente en el que el kit comprende además un agonista de señalización de Wnt; preferiblemente CHIR-99021 o

b)

- 55 – un primer medio acuoso que comprende un agonista de señalización de Wnt, preferiblemente CHIR-99021;
- un segundo medio acuoso que comprende XAV-939 y el segundo compuesto en el que el compuesto es IWP-L6 o C59, preferiblemente IWP-L6; y
- 60 – un tercer medio acuoso que no comprende XAV939, IWP-L6, C59 y un agonista de señalización de Wnt,

preferiblemente en el que el kit comprende además un cuarto medio acuoso, en el que el cuarto medio acuoso es para la maduración de cardiomiocitos derivados de células madre obtenidos in vitro.

65

También se proporciona una población de células de cardiomiocitos obtenida con el método de la invención, preferiblemente en la que la población de células de cardiomiocitos se asemeja a una población de células ventriculares humanas (fetales) o en la que al menos el 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de las células expresan mlc2v. Sorprendentemente, se encontró que con el método de la invención se puede obtener con alto rendimiento y con un período corto de tiempo, por ejemplo, dentro de los períodos que se divulgan en este documento, una población de cardiomiocitos derivados de células madre obtenidos in vitro que presentan características de células madre humanas cardiomiocitos ventriculares (como pueden determinarse usando técnicas convencionales conocidas por el experto en la materia), en particular en los que las células obtenidas expresan mlc2v. In vivo, MLC2v se expresa fuertemente en el miocardio ventricular y claramente más bajo en el tracto de salida y el canal auriculoventricular y es un marcador genuino de cardiomiocitos ventriculares.

En particular, se encontró que cuando el método de la invención comprende la etapa a), la etapa b) y la etapa d), incluso más preferiblemente la etapa a), la etapa b), la etapa c) y la etapa d) se obtiene una población de cardiomiocitos maduros donde al menos el 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de las células expresan mlc2v. Antes de la etapa d), las células pueden recolectarse y congelarse en un medio adecuado antes de sembrar en placa y realizar la etapa d).

También se encontró que cuando el medio en la etapa b) no comprende vitamina A y/o derivados de la misma (por ejemplo, ácido retinoico, retinol, carotenoides retinianos, provitamina A y similares), cardiomiocitos, en particular cardiomiocitos ventriculares, se pueden obtener.

Se descubrió además que cuando los medios de las etapas a), b) y/o c) no comprenden vitamina A y/o derivados de la misma (por ejemplo, ácido retinoico, retinol, carotenoides retinianos, provitamina A y similares), se pueden obtener cardiomiocitos, en particular cardiomiocitos ventriculares. En estas realizaciones, también la etapa d) (si se realiza) se puede realizar con o sin vitamina A y/o derivados de la misma (por ejemplo, ácido retinoico, retinol, retinal, provitamina A y similares).

En otras palabras, también se proporciona un método in vitro para diferenciar una población de células madre pluripotentes humanas en una población de células de cardiomiocitos en el que al menos el 70, 80 %, 90 % o 95 % de las células expresan mlc2v, el método comprende realizar la etapa b) y la etapa d) como se define aquí, o realizar la etapa b), etapa c) y la etapa d) como se define aquí, o realizar la etapa a), etapa b) y etapa d) como se define aquí, o realizar la etapa a), etapa b), etapa c) y etapa d) como se definen en el presente documento. En una realización preferida, el método in vitro de diferenciar una población de células madre pluripotentes humanas en una población de células de cardiomiocitos en la que al menos el 70, 80 %, 90 % o 95 % de las células expresan mlc2v se concluye en un período de 50 días, preferiblemente 35 días, incluso más preferiblemente 30 días, incluso más preferiblemente 21 días. Por ejemplo, el método toma de 10 a 50 días, preferiblemente de 11 a 35 días, incluso más preferiblemente de 12 a 30 días, por ejemplo, de 14 a 21 días.

También se proporciona una población de células de cardiomiocitos humanos in vitro, preferiblemente una población de células de cardiomiocitos ventriculares humanos in vitro, en la que al menos el 80 %, 90 % o 95 % de las células expresan mlc2v, preferiblemente obtenidas con el método de la invención.

Habiendo descrito ahora en general la invención, la misma se entenderá más fácilmente mediante la referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitantes de la presente invención.

Ejemplos

Método de cultivo de células

Se cultivaron células madre pluripotentes humanas (hPSC) en alimentadores (fibroblastos embrionarios de ratón) con DMEM/F-12, medio GlutaMAX suplementado con 20 % de reemplazo de suero Knockout™, 1 % de NEAA, 10 ng/ml de b-FGF y β-mercaptoetanol 0.1 mM o en condiciones sin alimentador utilizando Essential 8™ Medium (Life Technologies) en placas recubiertas de vitronectina (VTN-N) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, o utilizando el sistema de cultivo L7 (Lonza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se pasaron de forma rutinaria usando Accutase (Sigma-Aldrich) en el caso de cultivos alimentadores o usando EDTA 0.5 mM para cultivos E8 o usando solución de pases L7 en el caso del sistema de cultivo L7. Los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora humidificada a 37 °C con 5 % de CO₂. Consulte, por ejemplo, <http://hpscereg.eu/cell-line/CRMi003-A> para células NCRM-1. Todas las líneas de células madre embrionarias humanas específicas citadas en estos ejemplos se citan solo como referencia.

Métodos de diferenciación

Para la diferenciación, las células se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de 60.000 células por pocillo o una proporción de división que se determinó empíricamente para dar un 30-80 % de confluencia después de 4 días. El medio de cultivo se reemplazó después de 4 días con un medio de diferenciación como se describe en este documento, por ejemplo, que contenía 46.5 % de IMDM (Gibco 21056), 0.25 % de Bovostar BSA, 46.5 % de Ham's F12 con Glutamax, 2 mM de Glutamax, 450 nM de alphaMTG, 0.05 mg/ml. ácido ascórbico, 0.5 % 5000 U/ml Pen/Strep (Gibco 12070), 0.01 %

1000 * Mezcla de oligoelementos B (Cellgro 99-176-CL), 0.1 % 1000 * Mezcla de oligoelementos C (Cellgro 99-176-CL). En varios experimentos se usó 0.1 % de ITS-x desde el día 4-14, es decir, durante la diferenciación de las células.

Para la maduración, se utilizó un medio de maduración como se divulga en el presente documento.

Métodos de recuento de células/pocillo.

Se determinó el número de células con una cámara de recuento Fuchs-Rosenthal. Brevemente, las células cultivadas en cultivos de monocapa se separaron de la superficie de la placa usando TrypLE™ Select Enzyme (Life Technologies). Se transfirió una suspensión celular uniforme al borde de la cámara de recuento del hemocitómetro. Se contaron las células y se determinó el número de células usando las siguientes ecuaciones:

$$\text{células/ml} = \text{recuento promedio por cuadrado} \times \text{factor de dilución} \times 5000$$

$$\text{células totales} = \text{células/ml} \times \text{volumen original total de suspensión celular de la que se tomó la muestra.}$$

Método de medición de NKX2.5

Las células informadoras de NKX-GFP hESC e iPSC se han descrito previamente. Estas células expresan la proteína fluorescente GFP bajo el control del promotor endógeno NKX2-5. Las células GFP + ve marcan los cardiomiocitos (Elliott DA et al. Nat. Methods, 8 (2011), págs. 1037-1040; van den Berg CW et al., Development. 24 de julio de 2015. pii: dev.123810. [Publicación electrónica adelante de impresión]). NKX 2.5 es un factor de transcripción esencial para el desarrollo del corazón y se expresa en el corazón durante toda la vida. La fluorescencia de GFP informa la expresión del gen NKX2.5 endógeno y permite la identificación/cuantificación de cardiomiocitos derivados de hPSC durante la diferenciación.

Método de medición de TNNT2 (usando FACS)

El porcentaje de células que expresan TNNT2 se midió mediante análisis de citometría de flujo. Brevemente, las células se disociaron con TrypLE™ Select Enzyme (Life Technologies), se lavaron con PBS, se fijaron y se permeabilizaron con FIX & PERM® Cell Fixation and Permeabilization Kit (Life Technologies). Las muestras se incubaron con troponina T (TNNT2), isoforma cardíaca Ab-1, anticuerpo monoclonal de ratón (ThermoFisher, MS-295-P1; a una dilución de 1: 1000) seguido de incubación con anticuerpo secundario Donkey Anti-mouse APC (Jackson Immuno, 715 -136-151;; a una dilución de 1: 500) ambos diluidos en Fix & Perm Medium B. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo Novocyt™ (ACEA Biosciences) o en un instrumento MACSQuant VYB (Miltenyi Biotech).

Método de medición de MLC2v y troponina

Mlc2v es específico para células ventriculares mientras que la troponina T cardíaca (TNNT2) se expresa tanto en células auriculares como ventriculares. Se midieron Mlc2v y TNNT2 mediante análisis de citometría de flujo como se mencionó anteriormente. El porcentaje de células que expresan TNNT2 y Mlc2v se midió mediante análisis de citometría de flujo. Las células se disociaron con TrypLE™ Select Enzyme (Life Technologies), se lavaron con PBS, se fijaron y se permeabilizaron con FIX & PERM® Cell Fixation and Permeabilization Kit (Life Technologies). Las muestras se incubaron con troponina T, isoforma cardíaca Ab-1, anticuerpo monoclonal de ratón (ThermoFisher, MS-295-P1; a una dilución de 1: 1000) y conejo-anti-MLC2V Ab (ProteinTech 10906-1-AP; a 1: 200 dilución) seguido de incubación con anticuerpos secundarios. Medio B (Tecnologías de la vida). Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo Novocyt™ (ACEA Biosciences) o en un instrumento MACSQuant VYB (Miltenyi Biotech).

Resultados

La figura 1 muestra una descripción general esquemática de ejemplo de una realización del método de la invención.

La Figura 2 muestra resultados ejemplares de experimentos que estudian los efectos de los inhibidores de wnt sobre la diferenciación de las células madre. Para los datos de la figura, se cultivaron células madre indicadoras de NKX2-5-GFP en alimentadores en DMEM-F12 complementado con KOSR/bFGF (Amit, M. et al. (2004) Biol Reprod 70, 837-45.). Las células informadoras NKX-GFP hESC e iPSC se han descrito previamente. Estas células expresan la proteína fluorescente GFP bajo el control del promotor endógeno NKX2-5. Las células GFP + ve marcan los cardiomiocitos (Elliott DA et al. Nat. Methods, 8 (2011), págs. 1037-1040; van den Berg CW et al., Development. 24 de julio de 2015. pii: dev.123810. [Publicación electrónica adelante de impresión]). Para iniciar la diferenciación, las células se disociaron usando Accutase y se resuspendieron en mTesR (StemCell Technologies; Ludwig TE et al. Nat Methods 3: 637-46, 2006) a una concentración de células 60.000/ml, la suspensión celular se sembró sobre Matrigel recubierto en placas de 12 pocillos. Las células se mantuvieron durante 4 días antes del inicio de la diferenciación. Las células se trataron durante 2 días con 5 microMolar CHIR99021, seguido de 2 días de cultivo en presencia de IWP-L6/XAV-939 (o C59/IWPL-6), luego las células se cultivaron durante 10 días en el medio de diferenciación en la ausencia de Wnt que inhibe moléculas pequeñas. El porcentaje de cardiomiocitos se determinó el día 14 de diferenciación usando citometría de flujo para la

detección/cuantificación de células positivas para GFP. La combinación de IWP-L6 y XAV es la más efectiva. Se ha observado que la medición de células de expresión de GFP da una subestimación del porcentaje de células TNNT2.

5 La Figura 3 muestra resultados ejemplares que estudian los efectos de los inhibidores de wnt sobre la diferenciación de las células madre. Aquí, las células madre indicadoras de NKX2-5-GFP se cultivaron en alimentadores en DMEM-F12 complementado con KOSR/FGF. Para iniciar la diferenciación, las células se disociaron usando Accutase y se resuspendieron en mTesR a una concentración de células 60.000/ml, la suspensión celular se sembró en placas de 12 pocillos revestidas con Matrigel. Las células se mantuvieron durante 4 días antes del inicio de la diferenciación. Las células se trataron durante 2 días con 5 microMolar CHIR99021, seguido de 2 días de cultivo en presencia de moléculas pequeñas inhibidoras de wnt especificadas, luego las células se cultivaron durante 10 días en medio de diferenciación. El porcentaje de cardiomiocitos se determinó el día 14 de diferenciación usando citometría de flujo para la detección/cuantificación de células positivas para GFP. Los resultados muestran que la reducción de IWP-L6 de 2 microMolar a 0.25 microMolar aumenta aún más la eficiencia de diferenciación. Se ha observado que la medición de células de expresión de GFP da una subestimación del porcentaje de células TNNT2.

15 La Figura 4 muestra la titulación de XAV-939 y los efectos sobre la diferenciación. Se cultivaron dos estirpes de hiPSC en alimentadores en DMEM-F12 complementado con KOSR (InvitroGen)/FGF. Para iniciar la diferenciación, las células se disociaron usando Accutase y se resuspendieron en mTesR a una concentración de células 60.000/ml, la suspensión celular se sembró en placas de 12 pocillos revestidas con Matrigel. Las células se mantuvieron durante 4 días antes del inicio de la diferenciación. Las células se trataron durante 2 días con 5 microMolar CHIR99021, seguido de 2 días de cultivo en presencia de moléculas pequeñas inhibidoras de Wnt específicas, luego las células se cultivaron durante 10 días en medio de diferenciación. El porcentaje de cardiomiocitos (Figura 4A; % de células positivas para TNNT2 en el día 14) se determinó el día 14 de diferenciación usando citometría de flujo para el marcador pancardiaco Troponina-T (TNNT-2). Los datos confirman que XAV939 a 5 microMolar es una concentración óptima, un mayor aumento de la concentración reduce la eficiencia de diferenciación. La adición de IWP-L6 a 0.25 microMolar mejora aún más la diferenciación. La presencia y ausencia o concentración no tienen un efecto significativo sobre el número total de células (Figura 4B; recuento de células en el día 14, en millones de células/pocillo).

20 La Figura 5 muestra el efecto de los inhibidores de wnt sobre el rendimiento del sistema de diferenciación. Se cultivaron estirpes IPSC humanas en alimentadores en DMEM-F12 complementado con KOSR/FGF. Para iniciar la diferenciación, las células se disociaron usando Accutase y se resuspendieron en mTesR a una concentración de células 60.000/ml, la suspensión celular se sembró en placas de 12 pocillos revestidas con Matrigel. Las células se mantuvieron durante 4 días antes del inicio de la diferenciación. Las células se trataron durante 2 días con 5 microMolar CHIR99021, seguido de 2 días de cultivo en presencia de moléculas pequeñas inhibidoras de wnt específicas, luego las células se cultivaron durante 10 días en medio de diferenciación. El porcentaje de cardiomiocitos se determinó el día 14 de diferenciación mediante citometría de flujo para el marcador pancardiaco Troponina-T (TNNT-2). Aquí, IWP-L6 solo da una eficiencia de diferenciación de aproximadamente el 70 %, esto se incrementa aún más con la adición de XAV939.

30 La Figura 6 muestra el rendimiento de diferenciación utilizando diferentes sistemas de mantenimiento de hiPSC. Se utilizó un panel de hasta 2 estirpes hiPSC para probar el rendimiento del sistema de diferenciación cardíaca. Las células se mantuvieron en alimentadores (Amit, M. et al. (2004). Biol Reprod 70, 837-45.), Medio de cultivo L7 (Lonza; www.lonza.com/products-services/bio-research/stem-cells/pluripotent-stem-cells/pluripotent-stem-cells-and-media/l7-hpsc-reprogramming-and-hpsc-culture-system/l7-culture-system.aspx) o medio de cultivo Essential 8 (Thermo Fisher Scientific; Chen G. et al., Nat Methods 8 (5): 424-429, 2011; www.thermofisher.com/order/catalog/product/A1517001;tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/feeder_free_PSCs_in_essential8_medium.pdf). Las células de los tres sistemas de mantenimiento se cultivaron previamente durante 4 días antes de la diferenciación. Las células se trataron durante 2 días con 5 microMolar CHIR99021, 2 días con una combinación de 5 microMolar XAV939 y 0.25 microMolar IWP-L6 seguido de 10 días de cultivo en medio de diferenciación. El porcentaje de cardiomiocitos se determinó el día 14 de diferenciación mediante citometría de flujo para el marcador pancardiaco Troponina-T (TNNT-2).

35 Sorprendentemente, a pesar de la amplia gama de métodos de mantenimiento de hiPSC probados, los resultados son muy consistentes entre las condiciones experimentales, lo que confirma la solidez del método (PLM 2 es NCRM1).

40 La Figura 7 muestra hPSC-CM diferenciada de (A) PLM estirpe 1 y (B) NCRM-1 hiPSC. Las estirpes de hiPSC se cultivaron en alimentadores en DMEM-F12 complementado con KOSR/FGF. Para iniciar la diferenciación, las células se disociaron usando Accutase y se resuspendieron en mTesR a una concentración de células 60.000/ml, la suspensión celular se sembró en placas de 12 pocillos revestidas con Matrigel. Las células se mantuvieron durante 4 días antes del inicio de la diferenciación. Las células se trataron durante 2 días con 5 microMolar CHIR99021, seguido de 2 días de cultivo en presencia de moléculas pequeñas inhibidoras de wnt específicas IWPL-6/XAV939, luego las células se cultivaron durante 10 días en medio de diferenciación. Las células se disociaron el día 14 y se criopreservaron. Las células se descongelaron y se volvieron a sembrar en medio de maduración como se divulga en el presente documento y se cultivaron durante 7 días (día 14 + 7). Los cardiomiocitos se caracterizaron mediante citometría de flujo con el marcador pancardiaco Troponina-T (TNNT-2) y el marcador ventricular MLC2v.

45 Las células son predominantemente del subtipo ventricular como se muestra por la expresión del marcador ventricular Mlc2v. Para la línea 1 de PLM, se obtuvo una eficiencia del 97.85 % de las células TNNT2 + y el 82 % de esta población

fue Mlc2v % +. Para NCRM-1, se obtuvo una eficiencia del 80.10 % de las células TNNT2 + y el 82 % de esta población fue del 75.05 % Mlc2v % +.

5 Aunque esta invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas de la misma, se entenderá que es capaz de realizar modificaciones adicionales. Esta solicitud está destinada a cubrir cualquier variación, uso o adaptación de las invenciones siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo las desviaciones de la presente divulgación que se encuentren dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la que pertenece la invención y como se puede aplicar a las características esenciales anteriormente expuestas como sigue en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

10 La referencia a etapas de métodos conocidos, etapas de métodos convencionales, métodos conocidos o métodos convencionales no es de ninguna manera una admisión de que cualquier aspecto, descripción o realización de la presente invención se divulgue, enseñe o sugiera en la técnica relevante.

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para diferenciar una población de células madre pluripotentes humanas en una población de células de cardiomiocitos, el método comprende
- 5 a) poner en contacto, antes de la etapa b), la población de células madre pluripotentes humanas con al menos un agonista de señalización de Wnt en un medio acuoso;
- 10 b) poner en contacto la población de células madre pluripotentes humanas con 3,5,7,8-tetrahidro-2- [4- (trifluorometil) fenil] -4H-tiopirano [4,3-d] pirimidin-4-ona (XAV-939) y un segundo compuesto en el que el compuesto es 2 - [(4-oxo-3-fenil-6,7-dihidrotieno [3,2-d] pirimidin-2-il) sulfanil] -N- (5-fenilpiridin-2 -il) acetamida (IWP-L6) en un medio acuoso; y
- 15 c) poner en contacto, después de la etapa b), la población de células madre pluripotentes humanas con un medio acuoso que no comprende XAV-939, dicho segundo compuesto y/o dicho agonista de señalización de Wnt,
2. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende además poner en contacto la población de células madre pluripotentes humanas con IGF, preferiblemente IGF de largo alcance en un medio acuoso.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa b) se inicia al menos 1 y hasta 7 días después del inicio de la etapa a) y/o en la que dicha etapa b) se concluye dentro de 35 días, preferiblemente dentro de 14 días, más preferiblemente dentro de los 5 días, incluso más preferiblemente dentro de los 3 días, más preferiblemente dentro de los 2 días después de su inicio.
- 20 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la etapa c) se concluye dentro de 35 días, preferiblemente dentro de 28 días, más preferiblemente dentro de 21 días, incluso más preferiblemente dentro de 14 días, lo más preferiblemente dentro de 10 días después de su inicio.
- 25 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que
- 30 - la concentración de XAV-939 es de 0.1 a 20 microM en el medio acuoso;
- la concentración IWP-L6 es 0.01 - 15 microM en el medio acuoso; y/o
- 35 - la concentración de IGF es de 0.01 a 10 ng/ml en el medio acuoso.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la relación XAV-939: IWP-L6 está entre 1:1 y 1:0.001, preferiblemente entre 1:0.1 y 1:0.01, más preferiblemente entre 1:0.2 y 1:0, 8, incluso más preferiblemente aproximadamente 1:0.05.
- 40 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración XAV-939 con la que se pone en contacto la población de células madre pluripotentes humanas en la etapa b) es una concentración, cuyo aumento no estimulará más la diferenciación de la población de células madre pluripotentes humanas en ausencia del segundo compuesto.
- 45 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la población de células madre pluripotentes humanas es una población de células madre embrionarias o una población de células madre pluripotentes inducidas.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el método comprende además,
- 50 d) cultivar la población de células de cardiomiocitos después de la etapa c) en un medio acuoso para madurar la población de células de cardiomiocitos, preferiblemente donde el medio acuoso comprende al menos glucosa, lípidos, carnitina, creatina, taurina, opcionalmente hormona tiroidea o análogos, y opcionalmente insulina, transferrina y selenio, preferiblemente en los que antes de la etapa d) las células se han recolectado y congelado antes de cultivarlas en la etapa d).
- 55 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende además el paso de verificar la presencia de cardiomiocitos después de la etapa b), etapa c) y/o d).
- 60 11. El método de la reivindicación 10, en el que se determina que al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de las células son cardiomiocitos.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el medio de la etapa b) no contiene vitamina A y/o derivado de la misma.
- 65 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el medio de la etapa a), b) y/o c) no contiene vitamina A y/o derivado de la misma.

14. Un kit para diferenciar una población de células madre pluripotentes humanas en una población de células de cardiomiocitos, el kit que comprende

5 a)

- XAV939;

- un segundo compuesto en el que el compuesto es IWP-L6 -;

10

- un medio acuoso; y

- opcionalmente IGF,

15 preferiblemente en el que el kit comprende además un agonista de señalización de Wnt, preferiblemente 6 - [[2 - [[4- (2,4-diclorofenil) -5- (5-metil-1H-imidazol-2-il) -2- pirimidinil] amino] etil] amino] -3-piridincarbonitrilo (CHIR-99021); o

b)

20 - un primer medio acuoso que comprende un agonista de señalización de Wnt, preferiblemente CHIR-99021;

- un segundo medio acuoso que comprende XAV-939 y el segundo compuesto en el que el compuesto es IWPL6; y

25 - un tercer medio acuoso que carece de XAV939, IWP-L6 y un agonista de señalización de Wnt, preferiblemente en el que el kit comprende además un cuarto medio acuoso, en el que el cuarto medio acuoso es para la maduración de cardiomiocitos derivados de células madre obtenidos in vitro.

30 15. Un método in vitro para diferenciar una población de células madre pluripotentes humanas en una población de células de cardiomiocitos en el que al menos el 70, 80 %, 90 % o 95 % de las células expresan la cadena ligera de miosina 2 ventricular (mlc2v), comprendiendo el método realizar la etapa a), etapa b) y etapa c) como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13 o realizar la etapa a), etapa b), etapa c) y etapa d) como se define en cualquiera de las reivindicaciones 9 - 13.

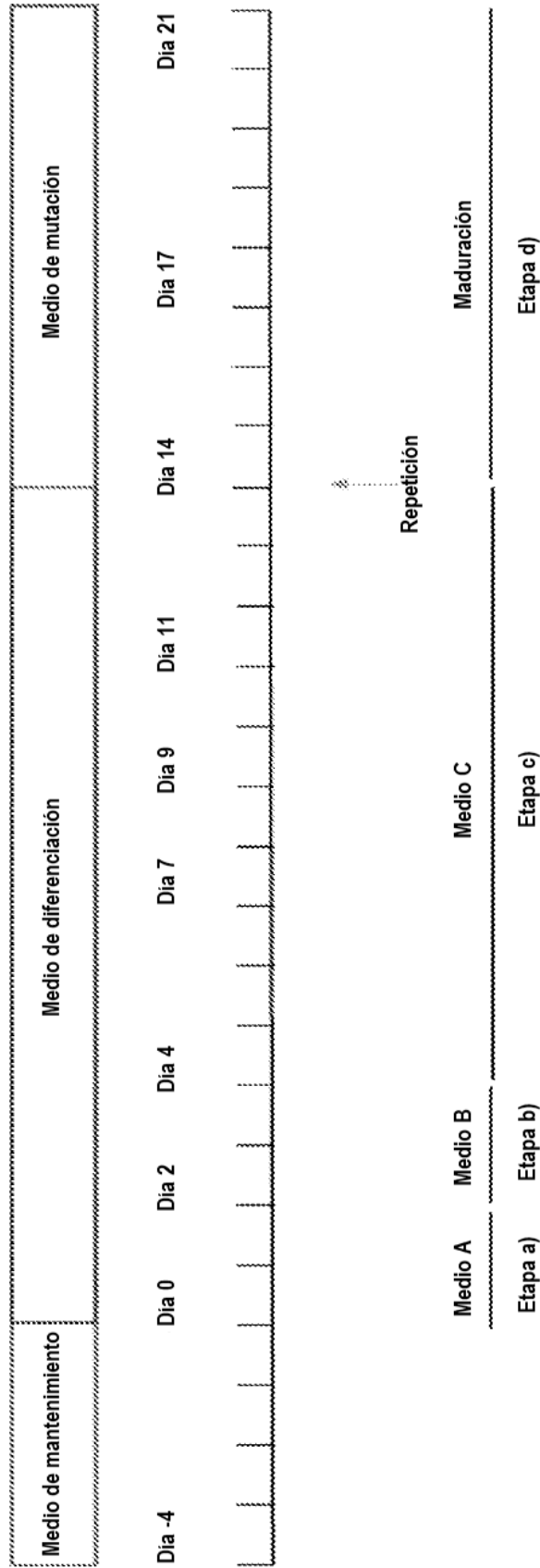


FIG. 1

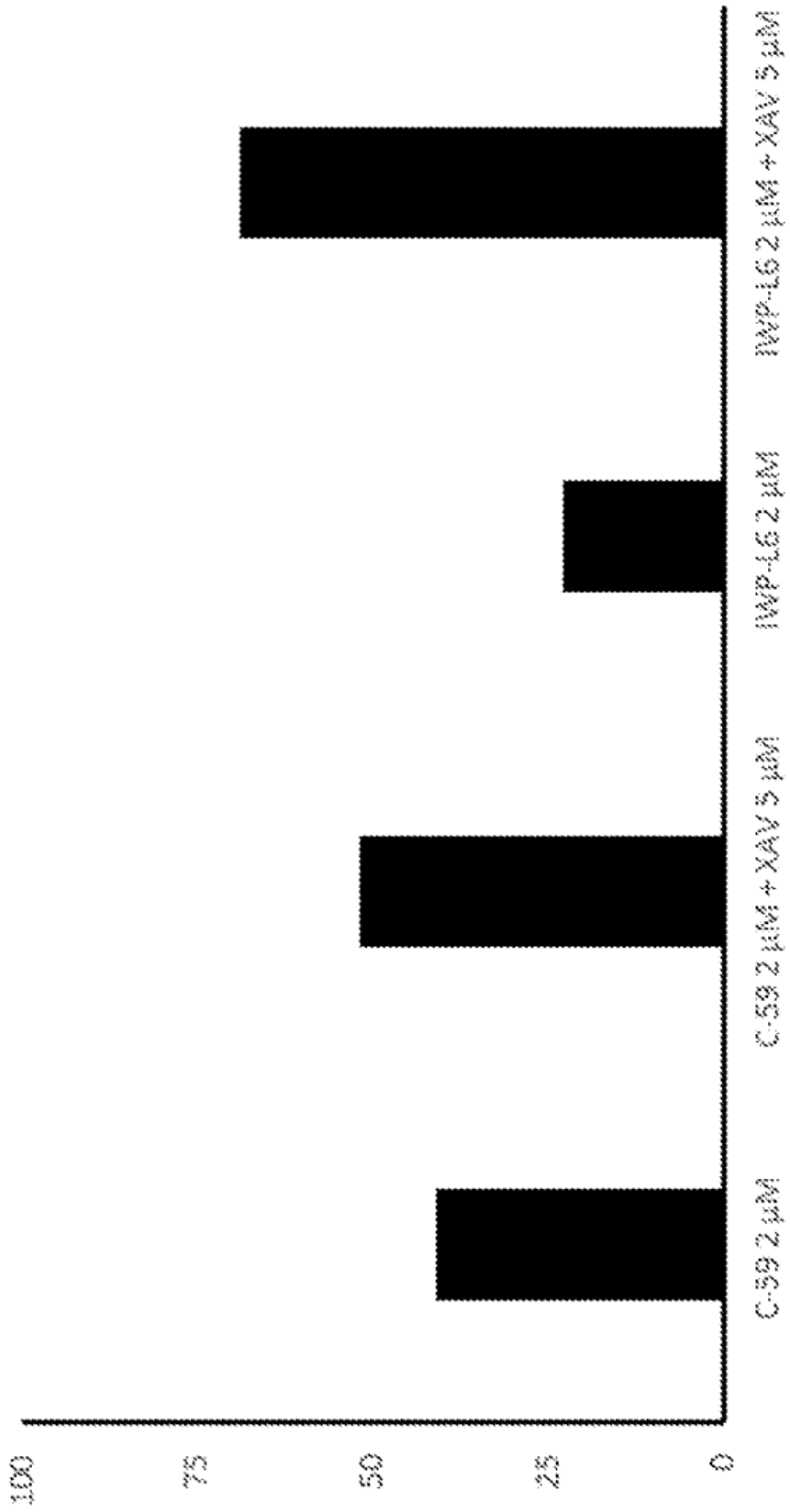


Fig 2.

Fig.3

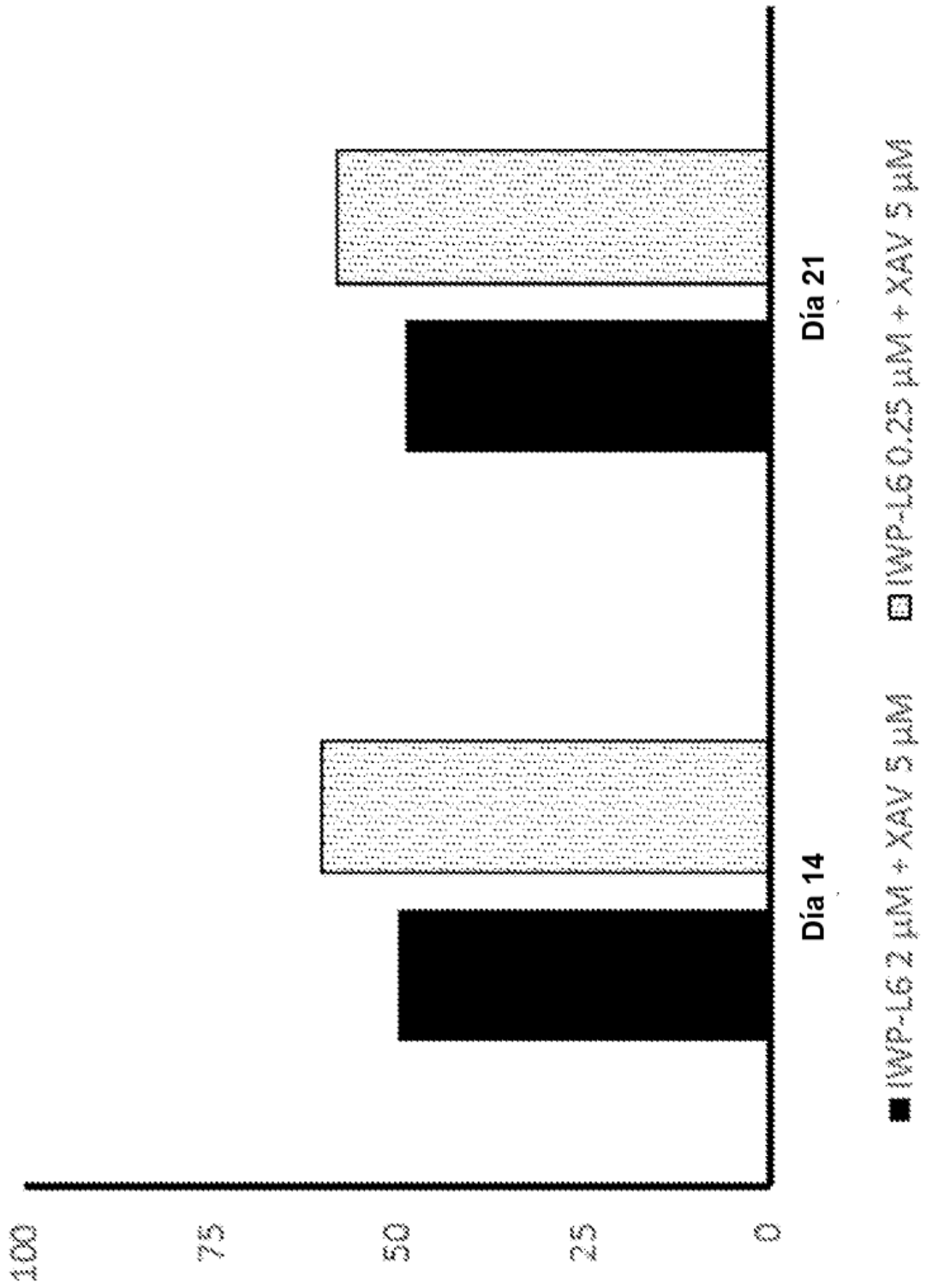


Fig 4A

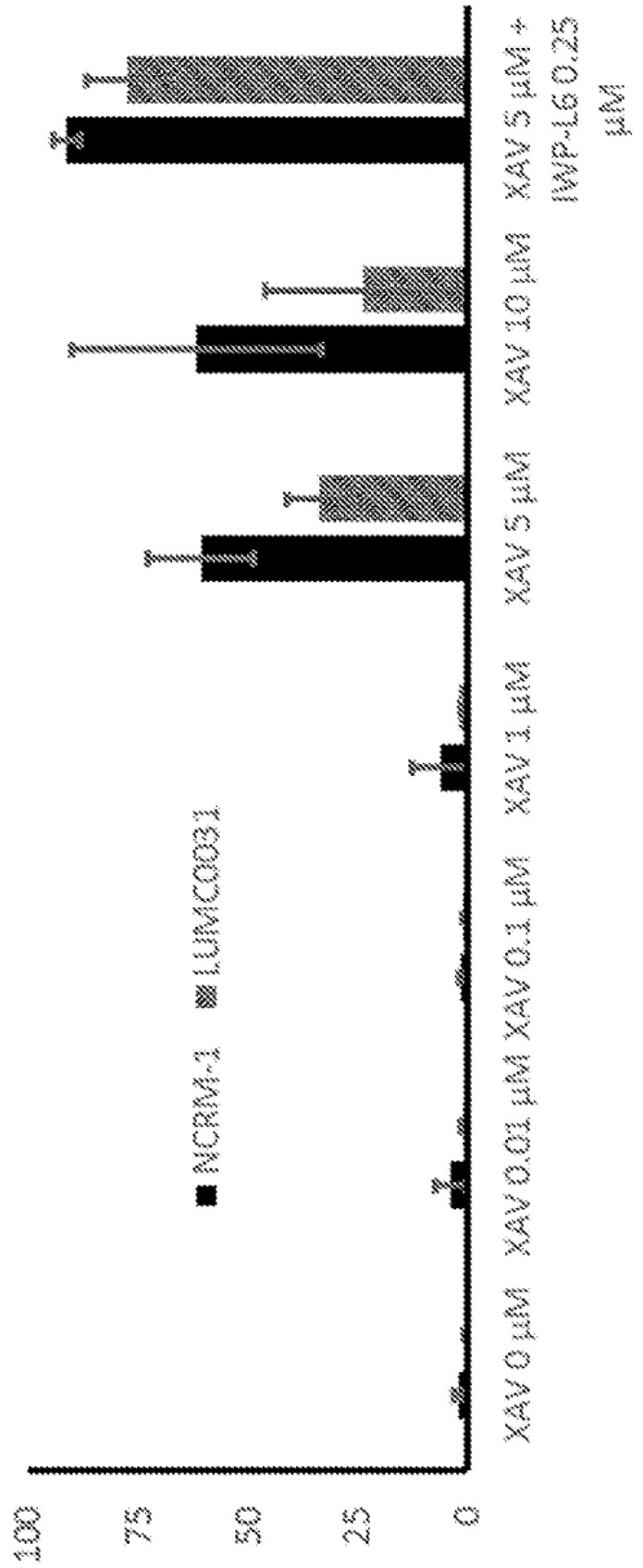


Fig 4B

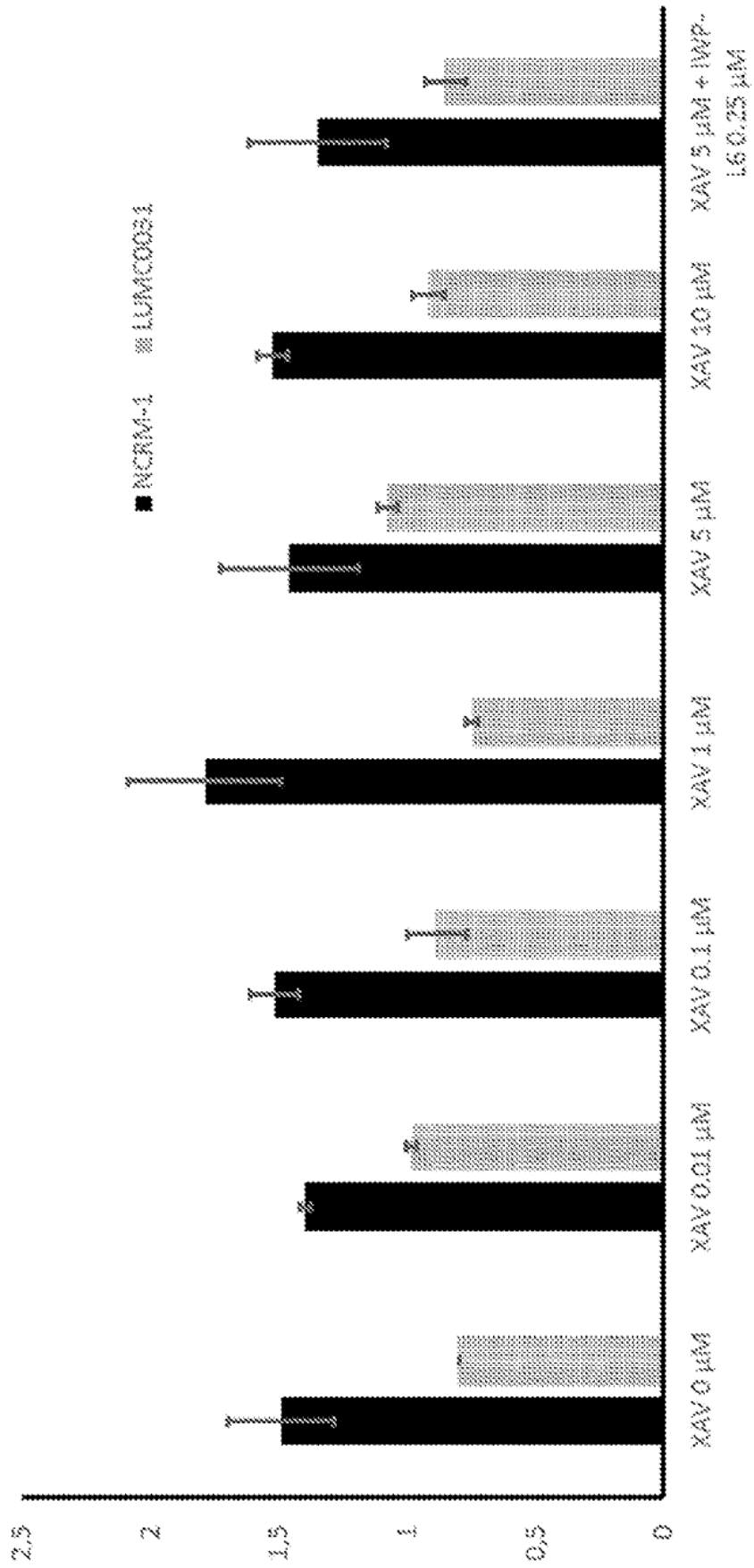


Fig 5

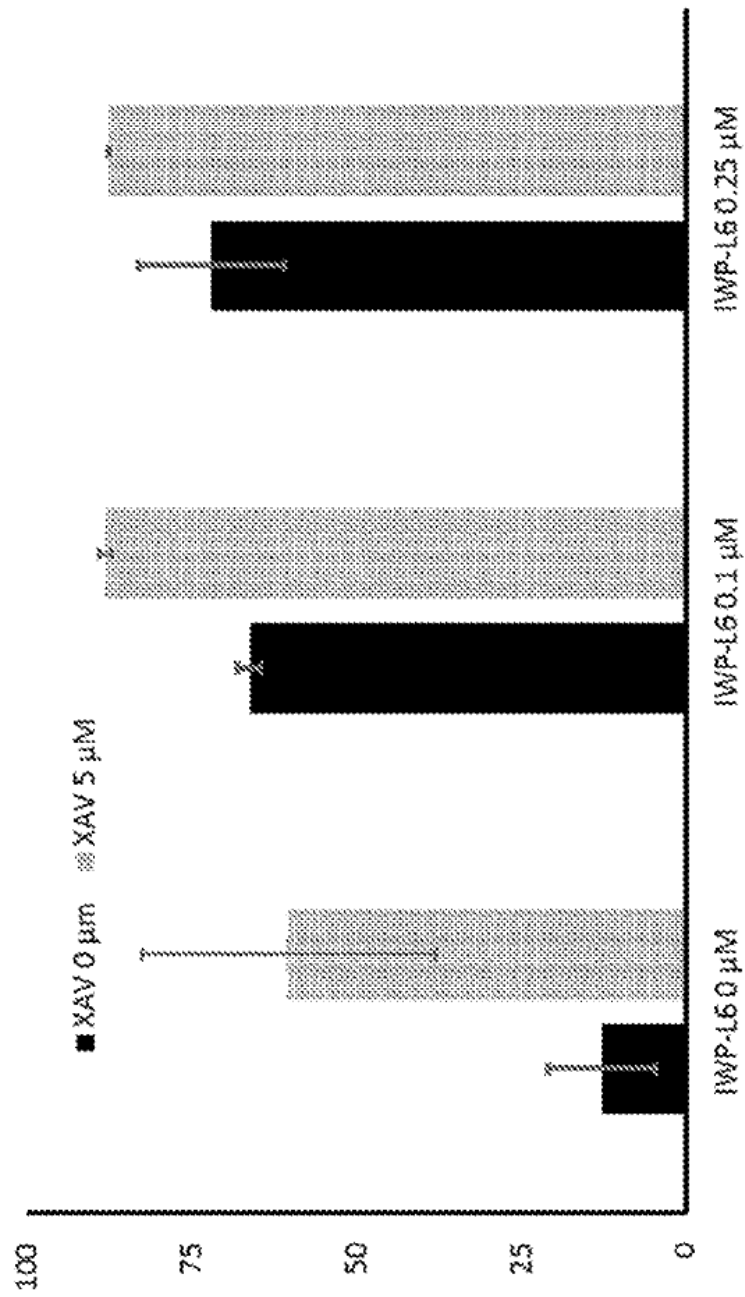


Fig. 6

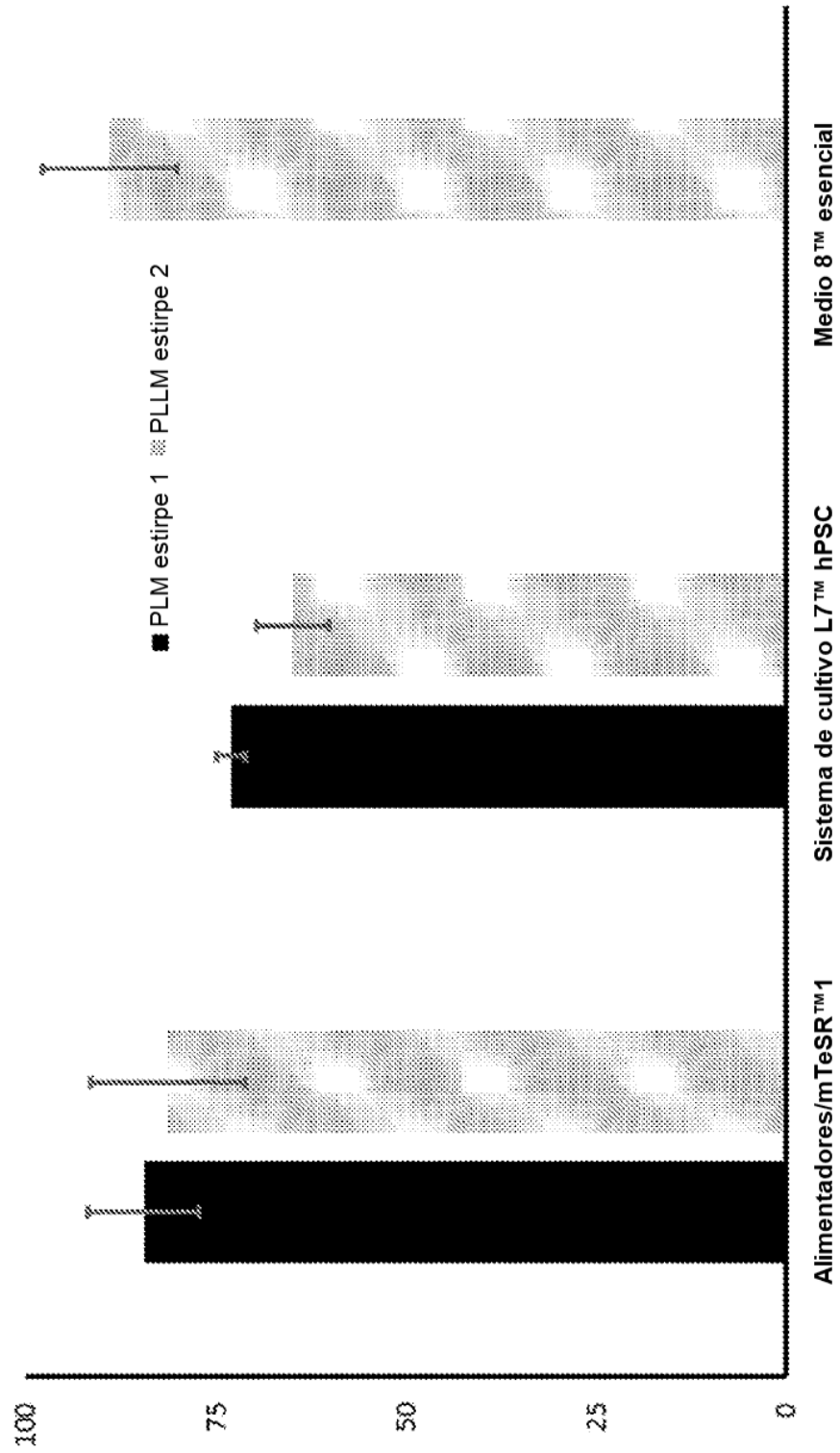
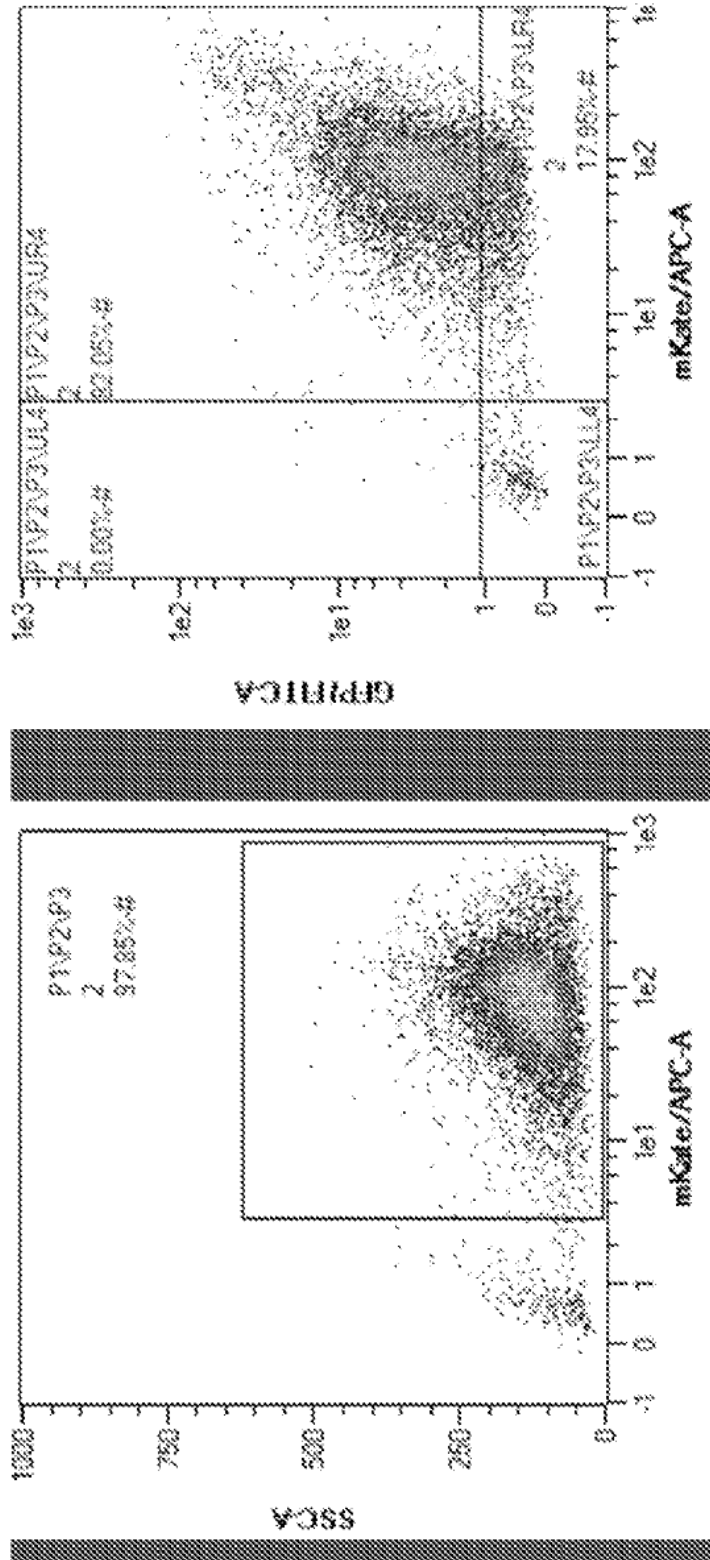


Fig 7A



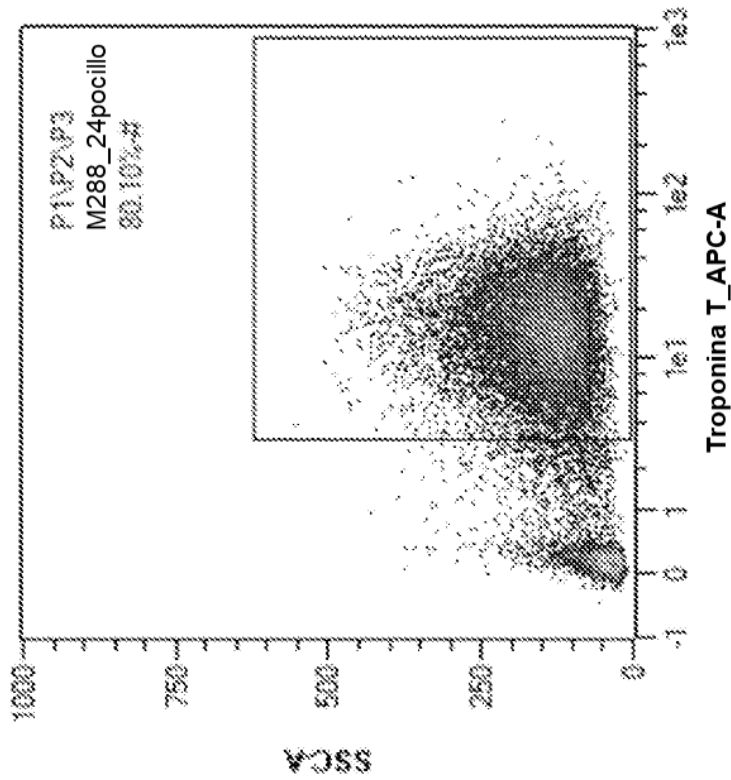
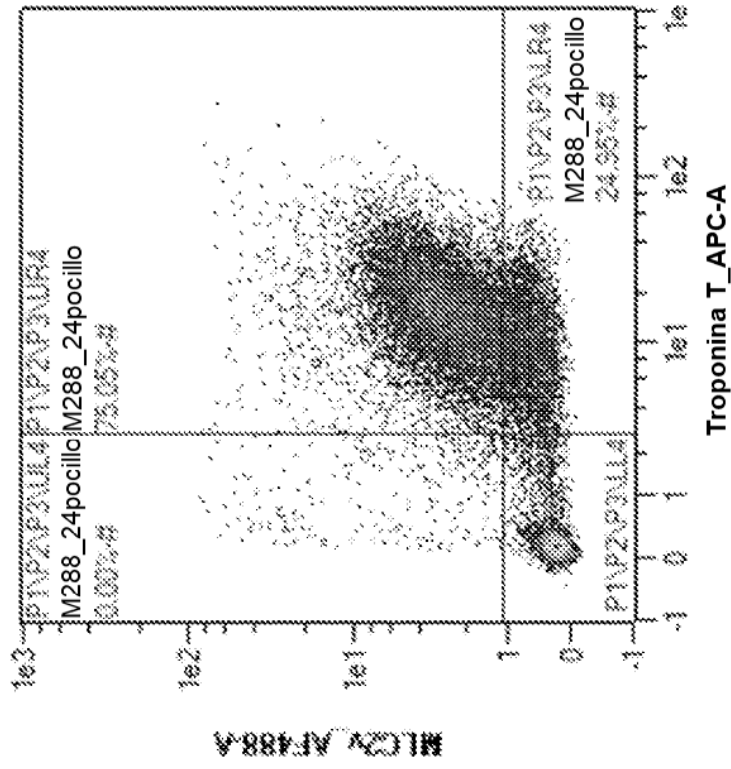


Fig 7B