



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0710949-0 A2**



(22) Data de Depósito: 27/04/2007
(43) Data da Publicação: 06/03/2012
(RPI 2148)

(51) *Int.Cl.:*
C12N 5/00
C07K 14/47
C12N 5/077
A61L 27/00
C12N 15/09

(54) Título: MÉTODO PARA INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO PLURIPOTENTES EM CARDIOMIÓCITOS

(30) Prioridade Unionista: 28/04/2006 JP 2006-125148, 30/01/2007 JP 2007-019531

(73) Titular(es): Asubio Pharma Co., Ltd.

(72) Inventor(es): Kayoko Kawashima, Michinori Kadokura, Tomofumi Tanaka, Uichi Koshimizu

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT JP2007059242 de 27/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/126077de 08/11/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO PLURIPOTENTES EM CARDIOMIÓCITOS. A presente invenção fornece um método para a indução de diferenciação em cardiomiócitos, de maneira eficiente e seletiva, a partir de células tronco. Um método para indução de diferenciação em cardiomiócitos a partir de células tronco pluripotentes, que compreende: (i) o cultivo das células tronco pluripotentes em um meio de cultura não contendo qualquer substância que promova a ativação da via de sinalização Wnt canônica durante o período de tempo entre o início da indução de diferenciação e 24 horas antes do período de elevada expressão de gene Wnt canônico; e, então, (ii) o cultivo das células tronco pluripotentes em um meio de cultura contendo uma substância, que promova a ativação da via de sinalização Wnt canônica durante um período de tempo de 24 a 96 horas, partindo de 24 a 0 horas antes do período de elevada expressão de gene Wnt canônico.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODO PARA INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO PLURIPOTENTES EM CARDIOMIÓCITOS".

CAMPO TÉCNICO

5 A presente invenção se refere a um método para preparação de cardiomiócitos de maneira seletiva e eficiente a partir de células ES e de outras células tronco pluripotentes.

ANTECEDENTES DA TÉCNICA

(1) Preparação de cardiomiócitos usando células tronco pluripotentes

10 Em geral, cardiomiócitos sofrem divisão de células ativas com batimento de maneira autônoma antes do nascimento, mas, imediatamente antes do nascimento elas perdem a capacidade de se dividirem, e, uma vez que elas têm muito poucas células tronco não diferenciadas e células precursoras, cujas capacidades de crescimento e de diferenciação são extremamente baixas, quando cardiomiócitos morrem devido à exposição à várias formas de estresse, incluindo infarto do miocárdio, miocardite e os similares, a perda de cardiomiócitos não pode ser regenerada. Como um resultado, a sobrevivência de cardiomiócitos tenta manter a função do miocárdio através de hipertrofia compensatória e os similares, mas, se o estresse continuar e exceder um limiar permissível, ele conduz a exaustão ulterior e à morte de cardiomiócitos e a uma conseqüente diminuição da função do miocárdio (isto é, falência cardíaca).

25 A falência cardíaca e outros tipos de doenças cardíacas são a segunda causa responsável por morte no Japão, e prognoses são muito pobres, com taxa de sobrevivência de 5 anos de somente cerca de 50% para pacientes com doenças do coração. Portanto, espera-se que o desenvolvimento de terapias altamente eficazes para falência cardíaca conduzirão a grandes avanços no arsenal médico, assim como na economia médica aperfeiçoada. Drogas terapêuticas convencionais para falência cardíaca incluem preparações de *digitalis*, que aumentam a força contrativa do miocárdio, e preparações de xantina e outros estimulantes do coração, mas, sabe-se que 30 a administração de longo prazo destas drogas torna a condição pior porque

há gasto excessivo de energia do miocárdio. Mais recentemente, a corrente principal da terapia tem se deslocado para β -bloqueadores e inibidores de ACE, que reduzem o ônus excessivo sobre o coração, devido à estimulação do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina, mas, estes métodos somente lidam com os sintomas imediatos e não podem restaurar o tecido cardíaco lesionado. Ao contrário, transplante de coração é um tratamento fundamental para a falência cardíaca severa, mas, ele é um que é difícil de aplicar de maneira comum por causa de problemas tais como a carência de doadores de coração, questões éticas, o ônus físico e financeiro sobre os pacientes e similares.

Portanto, pareceria que métodos de transplantes para substituir cardiomiócitos enfraquecidos ou perdidos seriam extremamente úteis para o tratamento de falência cardíaca. De fato, sabe-se a partir de experimentos com animais que, quando cardiomiócitos imaturos obtidos a partir de fetos são transplantados para tecido cardíaco adulto, as células transplantadas funcionam de maneira eficaz (ver o Documento de Não Patente 1). Entretanto, é difícil obter cardiomiócitos suficientes para esse método, e a aplicação à medicina clínica é também difícil de um ponto de vista ético.

Portanto, tem se concentrado atenção, em anos recentes, sobre a indução de diferenciação de células tronco em cardiomiócitos e o uso destas células para transplante. Atualmente, ainda não foi possível identificar claramente uma população de células precursoras ou de células tronco capazes de produzir cardiomiócitos em tecido cardíaco adulto; assim, células tronco pluripotentes, que são menos diferenciadas e podem se diferenciar em uma variedade de células, são consideradas como sendo úteis para o método acima.

Células tronco pluripotentes são definidas como células que são capazes de proliferação celular indefinida ou de longo prazo, enquanto permanecem em um estado não diferenciado em uma cultura *in vitro*, que retêm cariótipos normais e que têm a capacidade de se diferenciarem em todas as três camadas germinativas (ectoderma, mesoderma e endoderma) sob condições apropriadas. As três células tronco pluripotentes bem conhecidas são

células tronco embrionárias (células ES), derivadas de embriões em estágios prematuros, células germinativas embrionárias (células EG) derivadas de células germinativas primordiais no estágio embrionário e células tronco de linhagem germinativa (células GS) derivadas de testículos imediatamente
5 depois do nascimento.

Em particular, há muito se sabe que células ES podem ser induzidas a se diferenciarem em cardiomiócitos *in vitro*. Células ES de camundongos foram usadas na maioria dos estudos preliminares. Quando células ES são cultivadas em cultura em suspensão como células únicas (células
10 individuais dispersas sem adesão entre células devido a tratamento com enzima ou similar) sem a presença de um fator de inibição de diferenciação, tal como fator inibidor de leucemia (LIF) ou similar, as células ES aderem-se umas às outras e se agregam, formando uma estrutura chamada de corpos embrióides (EBs), que são similares às estruturas embrionárias iniciais. Sa-
15 be-se também que cardiomiócitos com capacidade de batimento espontânea aparecem quando esses EBs são cultivados em suspensão ou em adesão sobre a superfície de dispositivos de cultura.

Cardiomiócitos derivados de células ES, preparados conforme descrito acima exibem propriedades muito similares àquelas de cardiomióci-
20 tos imaturos em corações fetais (Ver os Documentos de Não Patente 2 e 3). Além disso, confirmou-se a partir de experimentos com animais que, quando cardiomiócitos derivados de células ES são realmente transplantadas em tecidos cardíacos adultos, elas são altamente eficazes, com resultados similares àqueles obtidos por transplante de miocárdio fetal (ver o Documento de
25 Patente 1; o Documento de Não Patente 4).

Em 1995, Thomson et al. estabeleceram em primeiro lugar células ES a partir de primatas (ver o Documento de Patente 2; o Documento de Não Patente 5), e, portanto, a terapia de regeneração usando cardiomiócitos derivados de células tronco pluripotentes se tornou uma realidade. Subse-
30 quentemente, eles também foram bem sucedidos no isolamento e no estabelecimento de linhagens de células ES humanas a partir de embriões humanos prematuros (ver o Documento de Não Patente 6). Além disso, Gea-

rhart et al. estabeleceram linhagens de células EG humanas a partir de células germinativas primordiais humanas (ver o Documento de Não Patente 7; o Documento de Patente 3).

5 Kehat et al. (ver o Documento de Não Patente 8) e Xu et al. (ver o Documento de Patente 4; o Documento de Não Patente 9) relataram que células ES humanas podem se diferenciar em cardiomiócitos *in vitro*, como células ES de camundongo o fazem. De acordo com esses relatos, cardiomiócitos derivados de células ES humanas não somente têm a capacidade de bater espontaneamente, mas, também, de expressar e de produzir prote-
10 ínas específicas do miocárdio, tais como cadeias pesada e leve de miosina, α -actinina, troponina I e peptídeo natriurético atrial (ANP) e fatores de transcrição específicos do miocárdio, tais como GATA-4, Nkx2.5, MEF-2c e os similares, e, a partir de observação microanatômica e análise eletrofisiológica, parece que eles retêm as propriedades de cardiomiócitos imaturos no
15 estágio fetal, e poderiam ser usados para terapia regenerativa.

Entretanto, um problema sério permanece a ser elucidado para se usar cardiomiócitos derivados de células tronco pluripotentes para terapia de transplante de células e outras finalidades. Quando EBs são formados a partir de células ES ou de células EG por métodos convencionais, não so-
20 mente cardiomiócitos, mas, também, outros tipos de células diferenciadas, tais como células do sangue, células vasculares, células neurais, células intestinais, células ósseas e de cartilagem e os similares, são desenvolvidos. Além disso, a proporção de cardiomiócitos nessa população de células diferenciadas não é tão elevada, somente cerca de 5% a 20% do total.

25 Métodos de isolar somente cardiomiócitos a partir de uma mistura de vários tipos de células incluem um método de adição de uma modificação artificial aos genes de células ES, conferir resistência à droga ou expressão ectópica, e coletar de células tendo as propriedades de cardiomiócitos ou de suas células precursoras. Por exemplo, por introdução de um cas-
30 sete de genes capaz de expressar um gene de resistência à neomicina (G418) sob o controle do promotor de cadeia pesada de α -miosina em células ES de camundongo, Field e seus co-pesquisadores estabeleceram um

sistema, no qual células ES somente poderiam sobreviver em meio ao qual G418 tenha sido adicionado quando elas se diferenciaram em cardiomiócitos e expressaram o gene de cadeia pesada de α -miosina (ver o Documento de Patente 1; o Documento de Não Patente 4). 99% ou mais de células resistentes a G418 selecionadas por este método foram confirmados como sendo cardiomiócitos. No entanto, embora a pureza dos cardiomiócitos é extremamente elevada nesse método, o número final de cardiomiócitos obtidos é somente um pequeno percentual da contagem de células total, tornando difícil de se obter quantidades suficientes de cardiomiócitos para o transplante.

10 Xu et al. relataram que, quando células ES humanas são tratadas com 5-azacitidina, a percentagem de células troponina I positivas (cardiomiócitos candidatos) em EBs se eleva desde 15% para 44% (ver o Documento de Não Patente 9), mas, mesmo neste método a percentagem de cardiomiócitos em EBs não excede 50%. Além disso, 5-azacitidina é um agente de desmetilação que altera a expressão de genes por remoção de grupos metila ligados a ADN, e porque ele atua diretamente nos cromossomos, ela não é uma droga adequada para a preparação de células para transplante de células.

15 Outros métodos para produção de cardiomiócitos de maneira mais eficiente a partir de células ES incluem, no caso de células ES de camundongo, adição de ácido retinóico (ver o Documento de Não Patente 10), ácido ascórbico (ver o Documento de Não Patente 11), TGF β , BMP-2 (ver o Documento de Não Patente 12), PDGF (ver o Documento de Não Patente 13) e Dinorfina B (ver o Documento de Não Patente 14) e tratamento para aumentar a espécie de oxigênio reativo (ROS) (ver o Documento de Não Patente 15) e Ca²⁺ (ver o Documento de Não Patente 16) nas células, todos os quais são conhecidos a atuarem de maneira positiva para induzir a diferenciação em cardiomiócitos. Entretanto, diferenciação específica para cardiomiócito ou seletiva não foi conseguida com qualquer desses métodos.

25

30 Recentemente, o grupo de pesquisa incluindo os inventores demonstraram que, quando células ES são tratadas com um antagonista de BMP, a diferenciação em cardiomiócitos pode ser induzida de maneira mais eficiente e

seletiva do que em métodos convencionais (Documento de Patente 5; Documento de Não Patente 17).

(2) Papéis funcionais de proteínas Wnt durante a diferenciação e o desenvolvimento de cardiomiócitos

5 Proteínas Wnt, que são proteínas secretórias, são membros de um grupo de famílias de proteínas, cuja presença é amplamente encontrada não somente em animais vertebrados, mas, também, em animais invertebrados, tais como nematódios e insetos, e sabe-se que sua família de genes têm muitas espécies moleculares (Documentos de Não Patente 18 e 19).
10 Por exemplo, 19 genes Wnt (Wnt-1, 2, 2b/13, 3, 3a, 4, 5a, 5b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b, 9a, 9b, 10a, 10b, 11, 16) foram identificados em seres humanos e camundongos até agora. Proteínas Wnt codificadas por esses genes Wnt têm diferente especificidade em relação a tecidos, mas, são estruturalmente similares uns aos outros.

15 Quando proteínas Wnt contribuem como ligantes para os sistemas de sinalização intracelular, elas se ligam à família Frizzled (doravante abreviada como Fzd) de sete-transmembranas de receptores presentes na membrana celular. Existem várias vias que atuam à jusante de receptores Fzd, e a mais importante via é a inibição de fosforilação de β -catenina mediada por glicogênio sintase quinase (GSK)-3 β . Na ausência de sinais Wnt, β -
20 catenina é capturada em conjunto com GSK-3 β por Axina sobre proteína de *Adenomatous polyposis coli* (APC) e é rapidamente fosforilada por GSK-3 β . A β -catenina fosforilada sofre ubiquitinação e degradação mediada por proteassoma.

25 Por outro lado, quando proteínas Wnt se ligam a receptores Fzd, um fator intracelular Dishevelled é ativado para capturar para capturar GSK-3 β , por meio do que β -catenina não é fosforilada e permanece em forma livre dentro do citoplasma e, ulteriormente, migra para o núcleo. Depois de migração para o núcleo, β -catenina se liga a fator celular de fator-1/T de intensificador linfóide (doravante abreviado como LEF-1/TCF), presente no núcleo,
30 para formar um complexo de ativador de transcrição, por meio do que se induz a transcrição de um gene alvo. Uma tal via de sinalização envolvendo

a acumulação e migração nuclear de β -catenina é chamada de via Wnt “clássica” ou a via de sinalização de Wnt canônica, e refere-se a uma família de espécies moleculares (por exemplo, Wnt-1, Wnt-3a, Wnt-8a) capaz de ativar essa via, Wnt canônica. Sabe-se também que a ativação da via de

5 sinalização de Wnt canônica é induzida por tratamento com vários inibidores de GSK-3 β .

Sabe-se que ligantes de Wnt ativam não somente a via de β -catenina, mas, também outras vias de sinalização através de receptores Fzd. Tais vias de sinalização incluem a de polaridade de célula planar

10 (PCP), que ativa JNK (quinase N-terminal de Jun), um tipo de MAP quinase, e a via de Ca²⁺, que eleva a concentração de Ca²⁺ intracelular e ativa proteína quinase C através da ativação de proteína G trimérica e a subsequente ativação de fosfolipase C (Documento de Não Patente 19 e 20). Essas vias são chamadas de vias Wnt “não clássicas” ou vias de sinalização Wnt não

15 canônicas, ao contrário da via de sinalização Wnt canônica. Wnt-4 e Wnt-11 foram relatadas como sendo moléculas da família Wnt capazes de ativar tais vias, e estes ligantes Wnt atuam para inibir a via de sinalização Wnt canônica.

Deve-se observar que algumas espécies moleculares de proteína

20 Wnt têm a capacidade de ativar as vias tanto canônicas quanto não canônicas, dependendo do tipo de células alvo e de seu estágio de diferenciação, assim como diferenças em receptores Fzd expressos nas células alvo. Por exemplo, sabe-se que Wnt-5a atua como Wnt não canônico em sistemas de ensaio usados comumente, tais como formação de eixo secundário

25 em embriões de *Xenopus laevis* e carcinogênese de células epiteliais da glândulas mamárias, enquanto que Wnt-5a também foi relatada a induzir a estabilização de β -catenina e sua atividade de transcrição em células ES, isto é, ativar a via de sinalização Wnt canônica em células ES (Documento de Não Patente 21).

Sabe-se que proteínas Wnt estão envolvidas em uma variedade

30 ampla de funções biológicas durante o desenvolvimento, crescimento e diferenciação de várias células, tecidos e cânceres. Cardiomiócitos se desenvol-

vem a partir de uma parte do mesoderma de placa lateral no estágio inicial de desenvolvimento, e, então, se dividem repetidamente e crescem para formar um coração. A presença ou a ausência de sinais Wnt desempenha um papel importante neste processo, conforme demonstrado em vários casos. Por meio de exemplo, no estágio inicial de desenvolvimento aviário ou de *Xenopus laevis*, expressão ectópica e/ou forçada do gene Wnt-3a ou Wnt-8a, que ativa a via de sinalização Wnt canônica, inibe de maneira significativa a formação do coração (Documentos de Não Patente 22 e 23).

Por outro lado, os assim chamados antagonistas de Wnt (por exemplo, Frzb, Dkk-1), que se ligam a Wnt-3a ou Wnt-8a para inibir sua sinalização, promovem a formação do coração, sugerindo, portanto, que sinais Wnt canônicos atuam para inibir o desenvolvimento do miocárdio.

Ao contrário, sabe-se que a ativação de vias de sinalização Wnt não canônicas, que antagonizam sinais Wnt canônicos, induzem de maneira positiva o desenvolvimento e a diferenciação em cardiomiócitos. Pandur et al. (Documento de Não Patente 24) demonstraram que Wnt-11, que ativa vias não canônicas, sem ativar a via canônica, é um fator essencial para o desenvolvimento do coração em *Xenopus laevis*. Depois disso, o efeito de promoção de Wnt-11 também foi confirmado em sistemas de indução de diferenciação do miocárdio para células ES de camundongo (Documento de Não Patente 25) e células precursoras endoteliais vasculares (Documento de Não Patente 26). Em relação à ativação de vias de sinalização Wnt não canônicas, sabe-se também que cardiomiócitos podem ser induzidos a se diferenciarem a partir de células do tecido da língua (Documento de Patente 6).

Por outro lado, de maneira diferente dos casos acima, sabe-se que a ativação da via de sinalização Wnt canônica atua para promover a diferenciação do miocárdio a partir de células de carcinoma embrionárias (células EC). Células P19CL6, uma sublinhagem de células P19, que são um tipo de células EC, têm a propriedade de diferenciação em cardiomiócitos sob estimulação com sulfóxido de dimetila (DMSO). Quando Wnt-3a ou Wnt-8 foi adicionado ao meio, células P19CL6 foram promovidas a se dife-

renciarem em cardiomiócitos, conforme β -catenina fosse estabilizada (Documento de Não Patente 27). Nesse sistema, sabe-se também o período de tempo suficiente para adição de proteína Wnt é de 4 dias imediatamente da indução de diferenciação (Documento de Não Patente 28).

5 Linhagens de células P19 têm características parcialmente similares àquelas de células ES, pelo fato de que elas podem ser induzidas a se diferenciarem em cardiomiócitos e neurônios. Entretanto, linhagens de células P19 não têm a capacidade de se diferenciarem em uma variedade de células ou a capacidade de formar quimeras, de maneira diferente às células
10 ES. Além disso, linhagens de células P19 diferem grandemente de células ES em termos de marcadores de superfície celular, de genes expressos e assim por diante. A saber, linhagens de células P19 podem ser usadas como um sistema modelo para células ES em certos experimento, mas, nem sempre têm as mesmas características que as células ES. Portanto, não foi possível
15 prever, com base em fundamentos científicos, se as constatações obtidas neste sistema experimental poderiam ser extrapoladas de maneira direta para sistemas de indução de diferenciação do miocárdio para células ES e outras células tronco pluripotentes.

Recentemente, em sistemas experimentais usando células ES
20 de camundongo, proteína Wnt-3a, um membro de Wnt canônica, foi relatado a promover a diferenciação do miocárdio a partir de células ES, quando adicionada durante 3 dias depois de iniciação de indução de diferenciação (Naito A et al., 28th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 07 de dezembro de 2005 a 10 de dezembro de 2005, Hakata, Japão; Documento
25 de Não Patente 30). Entretanto, estudos similares realizado pelos inventores indicaram que não existe efeito de promoção significativo sobre a diferenciação (Exemplo 2), e outros grupos de pesquisa também relataram que o tratamento de células ES de camundongo com Wnt-3a não produz efeito particularmente significativo sobre a indução de diferenciação do miocárdio
30 (Documento de Não Patente 25) ou produz um efeito inibidor sobre a diferenciação do miocárdio (Documento de Não Patente 29). A saber, não está claro como a via Wnt canônica ativada atua sobre a diferenciação do mio-

cárdio a partir de células ES ou outras células tronco pluripotentes. Sob essas circunstâncias, nenhum método de cultura ótimo foi estabelecido para induzir a diferenciação do miocárdio.

5 Documento de Patente 1: Patente Norte-Americana de número
6.015.671

Documento de Patente 2: Patente Norte-Americana de número
5.843.780

Documento de Patente 3: Patente Norte-Americana de número
6.090.622

10 Documento de Patente 4: WO03/06950

Documento de Patente 5: WO2005/033298

Documento de Patente 6: JP 2005-224155 A

Documento de Não Patente 1: Soonpaa MH et al., Science,
264:98, 1994

15 Documento de Não Patente 2: Maltsev VA et al., Mechanism of
Development, 44:41, 1993

Documento de Não Patente 3: Maltsev VA et al., Circulation Re-
search, 75:233, 1994

20 Documento de Não Patente 4: Klug MG et al., Journal of Clinical
Investigation, 98:216, 1996

Documento de Não Patente 5: Thomson JA et al., Proceedings
of the National Academy of Sciences of the United States of America,
92:7844, 1995

25 Documento de Não Patente 6: Thomson JA et al., Science,
282:1145, 1998

Documento de Não Patente 7: Shambloott MJ et al., Proceedings
of the National Academy of Sciences of the United States of America,
95:13726, 1998

30 Documento de Não Patente 8: Kehat I et al., Journal of Clinical
Investigation, 108:407, 2001

Documento de Não Patente 9: Xu C et al., Circulation Research,
91:501, 2002

- Documento de Não Patente 10: Wobus AM et al., Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 29:1525, 1997
- Documento de Não Patente 11: Takahashi T et al., Circulation, 107:1912, 2003
- 5 Documento de Não Patente 12: Behfar A et al., FASEB Journal, 16:1558, 2002
- Documento de Não Patente 13: Sachinidis et al., Cardiovascular Research, 58:278, 2003
- 10 Documento de Não Patente 14: Ventura C et al., Circulation Research, 92:623, 2003
- Documento de Não Patente 15: Sauer H et al., FEBS Letters, 476:218, 2000
- Documento de Não Patente 16: Li J et al., Journal of Cell Biology, 158:103, 2002
- 15 Documento de Não Patente 17: Yuasa S et al., Nature Biotechnology, 23:607, 2005
- Documento de Não Patente 18: Nusse R, Cell Research, 15:28, 2005
- Documento de Não Patente 19: Widelitz R, Growth Factors, 20 23:111, 2005
- Documento de Não Patente 20: Kühl M et al., Trends in Genetics, 16:279, 2000
- Documento de Não Patente 21: Hao J et al., Developmental Biology, 290:81, 2006
- 25 Documento de Não Patente 22: Schneider VA & Mercola M, Genes and development, 15:304, 2001
- Documento de Não Patente 23: Marvin MJ et al., Genes and Development, 15:316, 2001
- Documento de Não Patente 24: Pandur P et al., Nature, 418:636, 30 2002
- Documento de Não Patente 25: Terami H et al., Biochemical and Biophysical Research Communication, 325:968, 2004

Documento de Não Patente 26: Koyanagi M et al., Journal of Biological Chemistry, 280:16838, 2005

Documento de Não Patente 27: Nakamura T et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100:5834, 2003

Documento de Não Patente 28: Naito AT et al., Circulation Research, 97:144, 2005

Documento de Não Patente 29: Yamashita JK et al., FASEB Journal, 19:1534, 2002

Documento de Não Patente 30: Naito AT et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103:19812, 2006

REVELAÇÃO DA INVENÇÃO

PROBLEMAS A SEREM SOLUCIONADOS PELA INVENÇÃO

É um objeto da presente invenção fornecer um método para a indução de diferenciação de células tronco pluripotentes não diferenciadas em cardiomiócitos, de maneira eficiente e seletiva, por ativação da via de sinalização Wnt canônica, em conjunto com cardiomiócitos obtidos por este método, e um método para usar estas células em transplante e injeção de células e outras terapias que tem por objetivo doença cardíaca.

MEIOS PARA SOLUCIONAR OS PROBLEMAS

Conforme a fonte de células tronco para preparar cardiomiócitos, os inventores usaram células tronco pluripotentes, especialmente células ES, que eram muitíssimo comumente usadas, e, como um resultado de extensa pesquisa, nas condições para indução de diferenciação em cardiomiócitos ou suas células precursoras, eles conceberam a presente invenção quando eles constataram que, quando uma substância, que promova a ativação da via de sinalização Wnt canônica (a que se refere, doravante, como "ativador de sinalização Wnt"), era adicionado ao meio durante um certo estágio de cultura restrito, populações de células tendo capacidade de batimento, que foram identificadas como cardiomiócitos, foram desenvolvidas de maneira muito mais seletiva e eficiente, do que nos métodos comumente

usados.

Células tronco pluripotentes, que podem ser usadas na presente invenção, incluem células ES, células EG e células GS, derivadas de mamíferos, tais como camundongos, macacos e humanos, assim como todas as células tronco pluripotentes que sejam caracteristicamente similares às células ES. Nesse caso, a similaridade característica às células ES é definida em termos de propriedades biológicas de células únicas em relação de células ES, tais como a presença de marcadores de superfície específicos das células ES (antígeno), a expressão de genes específicos das células ES ou a capacidade para produzir teratomas ou camundongos quiméricos.

Na presente invenção, exemplos específicos de uma substância, que promova a ativação da via de sinalização Wnt canônica, incluem várias proteínas Wnt canônicas, inibidores de GSK-3 β , e outros compostos de baixo peso molecular capazes de ativar a via de sinalização Wnt canônica. É também possível usar genes capazes de ativar a via de sinalização Wnt canônica, por exemplo, vários genes Wnt canônicos, assim como gene de β -catenina ou seus mutantes ativos, que sejam modificados para eliminar a extremidade N-terminal ou para substituir sítios de fosforilação de GSK-3 β com aminoácidos não fosforilados.

Na presente invenção, proteínas Wnt canônicas são membros do grupo de proteínas da família Wnt e são definidas como substâncias que se ligam aos receptores da família Fzd e inibem a fosforilação β -catenina mediada por GSK-3 β , para, por meio disto, promover a estabilização de β -catenina e sua capacidade de ativação de transcrição. Proteínas Wnt canônicas preferidas na presente invenção, incluem, por exemplo, Wnt-1, Wnt-3a, Wnt-5a e Wnt-8a, assim como aquelas que compartilham uma homologia de seqüência de aminoácidos de pelo menos 80%, mais preferivelmente, de pelo menos 90%, com estas proteínas e tendo a capacidade de ativar β -catenina.

Uma característica da presente invenção é que células ES ou outras células tronco pluripotentes são estimuladas de maneira transiente com um ativador de sinalização Wnt, e, embora o método de estímulo não

seja particularmente limitado, prefere-se um método de cultivo das células em meio contendo uma proteína Wnt canônica, por exemplo, uma sua proteína recombinante (a que se refere, doravante, como “proteína Wnt recombinante”) obtida deixando-se um gene Wnt canônico purificado a ser expresso.

5 Uma proteína Wnt canônica a ser usada e um gene que codifica a mesma são derivados, de preferência, a partir de animais da mesma espécie que aquela usada para derivar as células tronco pluripotentes, porém, aquelas derivadas a partir de animais de outra espécie também podem ser usadas. No caso de usar uma proteína Wnt recombinante, o meio de cultura é remo-

10 vido de maneira estéril e substituído por meio fresco contendo a proteína Wnt recombinante em uma concentração de 0,1 ng/mL a 500 ng/mL, de preferência, 1 ng/mL a 200 ng/mL, mais preferivelmente, 10 ng/mL a 100 ng/mL, e o cultivo é continuado.

Inibidores de GSK-3 β de acordo com a presente invenção são

15 definidos como substâncias que inibem a atividade de quinase de proteína de GSK-3 β (por exemplo, a capacidade de fosforilar β -catenina); e mais do que várias dezenas de inibidores já são conhecidos. Exemplos específicos incluem um derivado de indirubina BIO (também chamado de inibidor IX de GSK-3 β ; 6-bromoindirubina 3'-oxima), um derivado de maleimida SB216763

20 (3-(2,4-diclorofenil)-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona), um inibidor VII de GSK-3 β de composto de fenil- α -bromometil-cetona (4-dibromoacetofenona), e um peptídeo fosforilado permeável à célula L803-mts (também chamado de inibidor de peptídeo de GSK-3 β ; Myr-N-GKEAPPAPPQSpP-NH₂). Esses compostos estão comercialmente disponíveis a partir de Calbiochem ou Biomol e são fáceis de usar, mas, isto não é

25 uma limitação.

No caso em que esses inibidores de GSK-3 β forem usados, sua concentração ótima variará grandemente dependendo de diferenças em suas propriedades de compostos. Por essa razão, é necessário determinar a

30 concentração ótima de cada composto a ser usado. Por exemplo, no caso de BIO ou SB216763, meio contendo o inibidor de GSK-3 β em uma concentração, de preferência, de 10 nmoles/L a 1 μ mol/L, mais preferivelmente, 50

nmoles/L a 200 nmoles/L, é usada para a reposição de meio, e o cultivo é continuado. A concentração de inibidor VII de GSK-3 β a ser adicionado é, de preferência de 2 μ moles/L a 100 μ moles/L, e, mais preferivelmente, 5 μ moles/L a 20 μ moles/L. A concentração de L803-mts a ser adicionado é, de preferência de 5 μ moles/L a 500 μ moles/L, mais preferivelmente, de 20 μ moles/L a 200 μ moles/L, e, ainda mais preferivelmente, de 25 μ moles/L a 200 μ moles/L.

Em adição aos inibidores de GSK-3 β , drogas para uso na implementação da presente invenção podem ser compostos de baixo peso molecular, que promovam a ativação da via de sinalização Wnt canônica (a que se refere, doravante, como “agonistas de Wnt”). Exemplos preferidos incluem um derivado de aminopirimidina (2-amino-4-[3,4-(metilenodióxi)benzil-amino]-6-(3-metóxi-fenil)-pirimidina; Calbiochem) (Liu et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44:1987, 2005). No caso de usar um agonista de Wnt, meio contendo o agonista de Wnt em uma concentração de 1 nmol/L a 1.000 nmoles/L, de preferência, 10 nmoles/L a 500 nmoles/L, mais preferivelmente, de 50 nmoles/L a 200 nmoles/L, é usado para reposição de meio, e o cultivo é continuado.

O cronograma de tratamento com ativador de sinalização Wnt pode ser determinado com base nos padrões de expressão de vários genes Wnt canônicos durante diferenciação em células tronco pluripotentes para uso na implementação da presente invenção. mais especificamente, células tronco pluripotentes são induzidas para diferenciar de uma maneira rotineira, e mARNs são extraídos a partir de amostras coletadas periodicamente para analisar os níveis de expressão de vários genes Wnt canônicos por técnicas padrão, tais como RT-PCR. Um instante de tempo, no qual os níveis de expressão dos genes Wnt canônicos estiverem significativamente elevados, depois da indução de diferenciação, quando comparado às células tronco pluripotentes não diferenciadas, é definido como o “período de expressão de gene Wnt elevada”. Embora um único gene Wnt canônico possa ser usado para análise, de preferência, dois ou mais, mais preferivelmente, três ou mais genes são desejados.

Na implementação da presente invenção, células tronco pluripotentes são cultivadas em meio não contendo qualquer ativador de sinalização Wnt durante o período de tempo entre imediatamente depois do início da cultura para induzi a diferenciação do miocárdio e 24 horas antes do período de elevada expressão de gene Wnt, determinado conforme descrito acima. As células tronco pluripotentes são ulteriormente cultivadas em meio contendo um ativador de sinalização Wnt, de preferência, durante 24 a 96 horas, mais preferivelmente, durante 48 a 72 horas, partindo de um instante de tempo de 24 a 0 horas antes, de preferência, 24 horas antes do período de elevada expressão de gene Wnt, determinado conforme descrito acima. Deve-se observar que o período de tempo durante o qual as células são tratadas com um ativador de sinalização Wnt pode variar para se obter um período ótimo (horas), dependendo de diferenças de condições, tais como a espécie de animal a partir da qual as células a serem usadas são derivadas, o tipo de linhagem de células a serem usadas e/ou o tipo de ativador de sinalização Wnt a ser usado.

Cardiomiócitos derivados de células ES ou de outras células tronco pluripotentes, pelo método anteriormente mencionado, podem ser coletados ulteriormente, isolados e purificados por métodos conhecidos, para se obter, de maneira eficiente, grandes quantidades de cardiomiócitos altamente puros. Aos cardiomiócitos assim obtidos, depois disso, se refere como cardiomiócitos preparados de acordo com a presente invenção.

Cardiomiócitos preparados de acordo com a presente invenção são células que exibem as características morfológicas, fisiológicas e/ou imunocitológicas de cardiomiócitos. Em termos de características fisiológicas e/ou imunocitológicas, células preparadas de acordo com a presente invenção podem expressar um ou mais marcadores específicos em relação aos cardiomiócitos, que são reconhecidos como cardiomiócitos, mas, isto não é uma limitação.

Além disso, cardiomiócitos preparados de acordo com a presente invenção podem ser usados em métodos de seleção destinados a identificar drogas quimioterápicas potenciais ou novos fatores, que promovam o

desenvolvimento, diferenciação, regeneração, sobrevivência e os similares de cardiomiócitos.

Além disso, cardiomiócitos preparados de acordo com a presente invenção podem ser usados em métodos para tratamento de corações sofrendo de distúrbios cardíacos.

A saber, a presente invenção se refere, mas, não está limitada, ao seguinte:

(1) Um método para indução de diferenciação em cardiomiócitos a partir de células tronco pluripotentes, que compreende:

i) o cultivo das células tronco pluripotentes em um meio de cultura não contendo qualquer substância que promova a ativação da via de sinalização Wnt canônica durante o período de tempo entre o início da indução de diferenciação e 24 horas antes do período de elevada expressão de gene Wnt canônico; e, então

ii) o cultivo das células tronco pluripotentes em um meio de cultura contendo uma substância, que promova a ativação da via de sinalização Wnt canônica durante um período de tempo de 24 a 96 horas, partindo de 24 a 0 horas antes do período de elevada expressão de gene Wnt canônico.

(2) O método, de acordo com (1) acima, no qual as células tronco pluripotentes são cultivadas em um meio de cultura contendo uma substância que promova a ativação da via de sinalização Wnt canônica, partindo de 24 horas antes do período de elevada expressão de gene Wnt canônico.

(3) O método, de acordo com (1) ou (2) acima, no qual as células tronco pluripotentes são cultivadas em um meio de cultura contendo uma substância que promove a ativação da via de sinalização Wnt canônica durante um período de tempo de 48 a 72 horas.

(4) O método, de acordo com qualquer um de (1) a (3) acima, no qual a substância que promove a ativação da via de sinalização Wnt canônica é uma substância selecionada a partir do grupo consistindo em uma proteína canônica, um inibidor de GSK3 β e um agonista de Wnt.

(5) O método, de acordo com (4) acima, no qual a substância que promove a ativação da via de sinalização Wnt canônica é uma proteína Wnt

canônica.

- (6) O método, de acordo com (5) acima, no qual a proteína canônica é pelo menos uma proteína Wnt selecionada a partir do grupo consistindo em Wnt-1, Wnt-3a e Wnt-5a.
- 5 (7) O método, de acordo com (5) ou (6) acima, no qual a concentração da proteína Wnt canônica no meio de cultura é de 0,1 ng/mL a 500 ng/mL.
- (8) O método, de acordo com (4) acima, no qual a substância que promove a ativação da via de sinalização Wnt canônica é um inibidor de
- 10 GSK3 β .
- (9) O método, de acordo com (8) acima, no qual o inibidor de GSK3 β é pelo menos um inibidor selecionado a partir do grupo consistindo em inibidor VII de GSK3 β , L803-mts, SB216763 e inibidor IX de GSK3 β (BI-O).
- 15 (10) O método, de acordo com (8) ou (9) acima, no qual a concentração do inibidor de GSK3 β no meio de cultura é de 2 μ moles/L a 100 μ moles/L para inibidor VII de GSK3 β , 5 μ moles/L a 500 μ moles/L para L803-mts, 10 nmoles/L a 1 μ mol/L para SB216763 ou 10 nmoles/L a 1 μ mol/L para inibidor IX de GSK3 β (BIO).
- 20 (11) O método, de acordo com (4) acima, no qual a substância que promove a ativação da via de sinalização Wnt canônica é um agonista de Wnt.
- (12) O método, de acordo com (11) acima, no qual o agonista de Wnt é um derivado de aminopirimidina.
- 25 (13) O método, de acordo com (11) ou (12) acima, no qual a concentração do agonista de Wnt no meio de cultura é de 1 nmol/L a 1.000 nmoles/L.
- (14) O método, de acordo com qualquer um de (1) a (13) acima, no qual as células tronco pluripotentes são células tronco embrionárias, células germinativas embrionárias ou células tronco de linhagem germinativa.
- 30 (15) O método, de acordo com (14) acima, no qual as células tronco pluripotentes são células tronco embrionárias.

(16) O método, de acordo com (14) ou (15) acima, no qual as células tronco pluripotentes são de origem humana.

VANTAGENS DA INVENÇÃO

5 Células precursoras do miocárdio e cardiomiócitos podem ser produzidas de maneira muito eficiente e seletiva a partir de células ES e de outras células tronco pluripotentes usando o método da presente invenção. Células (precursoras) de cardiomiócitos preparadas pelo método da presente invenção podem ser usadas para se procurar e desenvolver drogas eficazes para o tratamento de doença do coração, e poderiam ser potencialmente aplicadas à terapia de transplante do miocárdio para doença severa do coração.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[Figura 1A] A Figura 1A mostra mudanças em expressão do gene Wnt durante a indução de diferenciação em células ES. Os símbolos na figura são definidos como se segue. Círculos abertos: grupo não tratado, 15 quadrados sólidos: grupo tratado com Cordina, triângulos sólidos: grupo tratado com DAN. O eixo vertical representa a razão relativa de níveis de expressão entre o gene Wnt e o gene GAPDH usado como um padrão interno. Igualmente, um asterisco (*) denota um instante de tempo no qual o nível de expressão do gene Wnt foi elevado de maneira significativa quando comparado às células ES não diferenciadas. 20

[Figura 1B] A Figura 1B mostra mudanças em expressão de gene Wnt durante a indução de diferenciação em células ES. Os símbolos na figura são definidos como se segue. Círculos abertos: grupo não tratado, 25 quadrados sólidos: grupo tratado com Cordina, triângulos sólidos: grupo tratado com DAN. O eixo vertical representa a razão relativa de níveis de expressão entre o gene Wnt e o gene GAPDH usado como um padrão interno. Igualmente, um asterisco (*) denota um instante de tempo no qual o nível de expressão do gene Wnt foi elevado de maneira significativa quando comparado às células ES não diferenciadas. 30

[Figura 1C] A Figura 1C mostra mudanças em expressão de gene Wnt durante a indução de diferenciação em células ES. Os símbolos na

figura são definidos como se segue. Círculos abertos: grupo não tratado, quadrados sólidos: grupo tratado com Cordina, triângulos sólidos: grupo tratado com DAN. O eixo vertical representa a razão relativa de níveis de expressão entre o gene Wnt e o gene GAPDH usado como um padrão interno. Iguualmente, um asterisco (*) denota um instante de tempo no qual o nível de expressão do gene Wnt foi elevado de maneira significativa quando comparado às células ES não diferenciadas.

[Figura 2A] A Figura 2A mostra o efeito sobre a aparência de EBs que batem causado por diferenças no cronograma de adição de uma proteína Wnt recombinante a um meio de cultura.

[Figura 2B] A Figura 2B mostra o efeito sobre a aparência de EBs que batem causado por diferenças no cronograma de adição de uma proteína Wnt recombinante a um meio de cultura.

[Figura 3A] A Figura 3A mostra a expressão de gene de marcador específico do cardiomiócito em EBs que batem, que apareceram depois da indução de diferenciação em células ES. O eixo vertical representa a razão relativa ao nível de expressão de gene no grupo não tratado (Nenhum), que é ajustado para 1.

[Figura 3B] A Figura 3B mostra a expressão de gene de marcador específico do cardiomiócito em EBs que batem, que apareceram depois da indução de diferenciação em células ES. O eixo vertical representa a razão relativa ao nível de expressão de gene no grupo não tratado (Nenhum), que é ajustado para 1.

[Figura 3C] A Figura 3C mostra a expressão de gene de marcador específico do cardiomiócito em EBs que batem, que apareceram depois da indução de diferenciação em células ES. O eixo vertical representa a razão relativa ao nível de expressão de gene no grupo não tratado (Nenhum), que é ajustado para 1.

[Figura 3D] A Figura 3D mostra a expressão de gene de marcador específico do cardiomiócito em EBs que batem, que apareceram depois da indução de diferenciação em células ES. O eixo vertical representa a razão relativa ao nível de expressão de gene no grupo não tratado (Nenhum),

que é ajustado para 1.

[Figura 4] A Figura 4 mostra o tingimento imuno-histoquímico de proteínas de marcador específico do cardiomiócito em EBs que batem, que apareceram depois da indução de diferenciação em células ES.

5 [Figura 5A] A Figura 5A mostra o efeito de um inibidor de GSK3 β sobre a aparência de EBs que batem.

[Figura 5B] A Figura 5B mostra o efeito de um inibidor de GSK3 β sobre a aparência de EBs que batem.

10 [Figura 5C] A Figura 5C mostra o efeito de um inibidor de GSK3 β sobre a aparência de EBs que batem.

[Figura 5D] A Figura 5D mostra o efeito de um inibidor de GSK3 β sobre a aparência de EBs que batem.

[Figura 5E] A Figura 5E mostra o efeito de um inibidor de GSK3 β sobre a aparência de EBs que batem.

15 [Figura 6] A Figura 6 mostra mudanças em expressão de gene Wnt-3 durante a indução de diferenciação em células ES se sagüi comum (macaco).

[Figura 7] A Figura 7 mostra a expressão de gene de marcados específico do cardiomiócito em EBs que batem, que apareceram depois da indução de diferenciação em células cmES.

20 [Figura 8] A Figura 8 mostra o tingimento imuno-histoquímico de proteínas de marcador específicas do cardiomiócito em EBs que batem, que apareceram depois da indução de diferenciação em células cmES.

MODOS PARA A REALIZAÇÃO DA INVENÇÃO

25 Modos para a realização da invenção serão mostrados abaixo, incluindo os efeitos acima da presente invenção, assim como outras vantagens e características.

30 Qualquer um que implemente a presente invenção pode consultar referências padrão com respeito aos métodos da engenharia genética, tais como biologia molecular e tecnologia do ADN recombinante, assim como métodos ordinários de biologia celular e da técnica anterior, a menos se indicado de outra maneira. Tais referências incluem, por exemplo, "Molecular

Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition” (Sambrook & Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001); “Current Protocols in Molecular biology” (Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, 1987); “Methods in Enzymology series” (Academic Press); “PCR Protocols: Methods in Molecular Biology” (Bartlett & Striling, eds., Humana Press, 2003); “Animal Cell Culture: A Practical Approach, Third Edition” (Masters, ed., Oxford University Press, 2000); e “Antibodies: A Laboratory Manual” (Harlow et al. & Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987). Os reagentes e kits para a cultura de células e estudos biológicos de células citados aqui podem ser obtidos a partir de fontes comerciais incluindo Sigma, Aldrich, Invitrogen/GIBCO, Clontech, Stratagene e as similares.

Igualmente, qualquer um que implemente a presente invenção pode consultar referências padrão com respeito aos métodos ordinários de cultura de células e a estudos de desenvolvimento e biológicos celulares usando células tronco pluripotentes. Esses incluem “Guide to Techniques in Mouse Development” (Wasserman et ál., eds., Academic Press, 1993); “Embryonic Stem Cell Differentiation in vitro” (M.V. Wiles, Meth. Enzymol. 225:900, 1993); “Manipulating the Mouse Embryo: A laboratory manual” (Hogan et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994); e “Embryonic Stem Cells” (Turksen ed., Humana Press, 2002). Os reagentes e kits para cultura de células e estudos de desenvolvimento e biológicos celulares citados aqui podem ser obtidos a partir de fontes comerciais, incluindo Invitrogen/GIBCO, Sigma e os similares.

Protocolos padrão também foram estabelecidos para a preparação, subcultivo e preservação de células tronco pluripotentes de camundongo e humanas, e, em adição às referências citadas acima, o operador pode usar tais células tronco pluripotentes por consulta a várias outras referências. Tais referências incluem: Matsui et al., Cell 70:841, 1992; Thomson et al., patente norte-americana de número 5.843.780; Thomson et al., Science 282:114, 1998; Shambloott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998; Shambloott et al., patente norte-americana de número 6.090.622; Reubinoff et al., Nat. Biotech. 18:399, 2000; e a Publicação Internacional de número

WO00/27995. Métodos para o estabelecimento de células ES ou de células semelhantes a células ES são também conhecidos para outras espécies animais, por exemplo, macacos (Thomson et al., patente norte-americana de número 5.843.780; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 7844, 1996), ratos (Iannaccone et al., Dev. Biol. 163:288, 1994; Loring et al., Publicação Internacional de número WO99/27076), aves (Pain et al., Development 122:2339, 1996; patente norte-americana de número 5.340.740; patente norte-americana de número 5.656.479) e porcos (Wheeler et al., Reprod. Fertil. Dev. 6:563, 1994; Shim et al., Biol. Reprod. 57:1089, 1997). De acordo com esses métodos descritos, células ES, para uso na presente invenção, podem ser preparadas e usadas.

Nesta revelação, "cardiomiócitos" incluem células precursoras cardíacas tendo a capacidade de se tornarem cardiomiócitos funcionais no futuro, assim como cardiomiócitos fetais e adultos em todos os estágios de diferenciação, e são definidos como células que podem ser identificadas por um ou, de preferência, mais do que um dos seguintes métodos, usando um ou, de preferência, mais do que um marcador ou índice.

A expressão de vários marcadores específicos em relação aos cardiomiócitos é detectada por métodos bioquímicos ou imunoquímicos convencionais. Não há limite particular sobre o método, mas, de preferência, um método imunoquímico, tal como tingimento imuno-histoquímico ou imunoeletroforese é usado. Nesses métodos, anticorpos policlonais específicos do marcador ou anticorpos monoclonais podem ser usados, que reajam com células precursoras cardíacas ou cardiomiócitos. Anticorpos para marcadores específicos individuais estão comercialmente disponíveis, e podem ser facilmente usados. Marcadores específicos para células precursoras cardíacas ou cardiomiócitos incluem, por exemplo, cadeias pesada e leve de mio-sina, α -actinina, troponina I, ANP, GATA-4, Nkx2.5, MEF-2c e os similares.

Alternativamente, embora o método não seja particularmente limitado, a expressão de genes de marcador específicos de células precursoras cardíacas ou específicos de cardiomiócitos também pode ser confirmada por reação em cadeia com polimerase de transcriptase reversa (RT-

PCR), métodos biológicos moleculares, que foram comumente usados no passado para a amplificação, detecção e análise de mRNA que codifique quaisquer proteínas de marcador. As seqüências de ácidos nucléicos que codificam proteínas de marcador específicas para células precursoras cardíacas e cardiomiócitos (tais como cadeias pesada e leve de miosina, α -actinina, troponina I, ANP, GATA-4, Nkx2.5 e MEF-2c) já são conhecidas e estão disponíveis através de bancos de dados públicos, tais como GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI), e as seqüências específicas do marcador, necessárias para uso como iniciadores ou sondas, podem ser facilmente determinadas.

Índices fisiológicos também podem ser usados adicionalmente para confirmar a diferenciação de células pluripotentes em cardiomiócitos. Por exemplo, marcadores úteis incluem batimento espontâneo por células derivadas de células pluripotentes, expressão de vários canais de íons e a capacidade de reagir a estímulo eletrofisiológico.

O método da presente invenção pode ser aplicado a células tronco pluripotentes de qualquer origem mamífera. Por exemplo, o método da presente invenção pode ser usado para células tronco pluripotentes derivadas a partir de camundongos, vacas, cabras, cães, gatos, sagüis, macacos rhesus ou seres humanos, mas, não está limitado a células tronco pluripotentes derivadas a partir destas espécies animais. Exemplos de células tronco pluripotentes disponíveis para uso na presente invenção incluem células ES derivadas a partir de mamíferos, tais como camundongos, macacos e seres humanos, as quais já são amplamente usadas como células cultivadas.

Exemplos específicos de células ES derivadas de camundongo incluem, células EB3, células E14, células D3, células CCE, células R1, células 129SV, células J1 e as similares. Células ES derivadas de camundongo, para uso na presente invenção, podem ser obtidas a partir, de por exemplo, American Type Culture Collection (ATCC), Chemicon, ou Cell & Molecular Technologies.

Células ES derivadas de macacos foram relatadas como sendo

estabelecidas a partir de macacos rhesus (*Macaca mulatta*) (Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844, 1995), macacos cinomolgus (*Macaca fascicularis*) (Suemori et al., Dev. Dyn. 222:273, 2001) e sagüis comuns (*Callithrix jacchus*) (Sasaki et al., Stem Cells. 23:1304, 2005), e podem ser usadas. Por exemplo, células ES de sagüi também podem ser obtidas a partir do Central Institute for Experimental Animals, Japão.

Atualmente, mais do que várias dezenas de linhagens de células ES derivadas de seres humanos foram estabelecidas ao redor do mundo. Por exemplo, muitas linhagens de células estão registradas na lista do US National Institutes of Health (<http://stemcells.nih.gov/registry/index.asp>) e podem ser usadas, embora estas linhagens de células também possam ser compradas a partir de, por exemplo, Cellartis, ES Cell International, ou Wisconsin Alumni Research Foundation. No Japão, linhagens de células ES humanas também podem ser obtidas a partir do Stem Cell Research Center, do Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University (Suemori et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 345:926, 2006).

Além disso, o estabelecimento de células ES foi também relatado para vacas (Mitalipova et al., Cloning 3:59, 2001), aves (Petitte et al., Mech. Dev. 121:1159, 2004) e peixe-zebra (Fishman, Science 294:1290, 2001).

Embora células ES sejam em geral, estabelecidas por cultivo de embriões em estágios iniciais, células ES também podem ser preparadas a partir de embriões em estágios iniciais, que estão modificados para terem núcleos de células somáticas por transplante nuclear (Munsie et al., Curr. Biol. 10:989, 2000; Wakayama et al., Science 292:740, 2001; Hwang et al., Science 303:1669, 2004). Além disso, há relatos acerca de uma tentativa de preparar células ES a partir de embriões partenogênicos, que tenham sido desenvolvidos em um estágio equivalente ao estágio blastocístico (Publicação de Patente Norte-Americana de número 02/168763; Vrana K et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:11911-6), assim como um método para a preparação de células ES tendo a informação genética de núcleos de células somáticas (Publicação Internacional de número WO00/49137; Tada et al., Curr. Biol. 11:1553, 2001). Células ES para uso na presente invenção também

incluem as células ES assim preparadas ou células ES cujos genes cromossômicos estejam modificados por procedimentos de engenharia genética.

Células tronco pluripotentes disponíveis para uso no método da presente invenção não estão limitadas a células ES e também incluem todas as células tronco pluripotentes caracteristicamente similares às células ES, que sejam derivadas a partir de, por exemplo, células de órgãos ou tecidos adultos humanos, células de medula óssea e células do sangue, assim como células fetais ou de embriões humanos. Nesse caso, a similaridade característica em relação às células ES é definida em termos de propriedades citobiológicas únicas para células ES, tais como a presença de marcadores de superfície específicos de células ES (antígeno), a expressão de genes específicos de células ES ou a capacidade de produzir teratomas ou camundongos quiméricos. Exemplos específicos incluem células ES preparadas a partir de células germinativas primordiais, células GS preparadas a partir de células germinativas testiculares e células tronco pluripotentes induzidas (células iPS) preparadas a partir de células somáticas, tais como fibroblastos, por manipulação de genes particulares.

Qualquer método adequado para induzir a diferenciação em cardiomiócitos pode ser usado como método de cultivo para a preparação de cardiomiócitos a partir de células ES ou de outras células tronco pluripotentes na presente invenção, e exemplos incluem cultivo em suspensão, cultivo em gota pendente, co-cultivo com células suportantes, cultivo giratório, cultivo em agar macio, cultivo em micro-veículo e os similares. Um exemplo específico é um método de suspensão de células ES como células únicas (células individuais dispersas em uma fase líquida sem adesão entre células devido à digestão com enzima ou similar) em meio para uma densidade celular de 1×10^3 a 1×10^5 células/mL, e depósito de uma gotícula de 10 a 100 μ L da suspensão por sobre o lado interno da placa superior de uma placa de cultura para efetuar cultura em gota pendente. Alternativamente, a suspensão de células acima pode ser semeada em uma placa comercialmente disponível, tal como uma placa de cultura de 96 cavidades para formação esférica (por exemplo, Sumilon Celltight Spheroid; Sumitomo Bakelite Co., Ltd.,

Japão), uma placa de cultura adesiva de não célula (por exemplo, placa de ultra-baixa fixação Coaster; Corning) ou uma placa de poliestireno não tratada. A suspensão contendo células ES é, então, cultivada à 37°C sob condições de CO₂ com aeração com dióxido de carbono à 5%, por meio do que

5 EBs são formados e induzidos a se diferenciarem em cardiomiócitos ou outras células.

Na presente invenção, a ativação da via de sinalização Wnt canônica significa um estado no qual β -catenina não está fosforilada por GSK-3 β e está estabilizada dentro do citoplasma e/ou núcleo, e/ou um estado no

10 qual a β -catenina se liga a LEF-1/TCF no núcleo, para formar um complexo de ativador de transcrição e, por meio disso, tem a capacidade de induzir transcrição de um gene alvo. Para determinar se a via de sinalização Wnt canônica está ativada, pode ser usado qualquer método, incluindo, mas, não limitado a, um método para medição da quantidade de β -catenina citoplás-

15 mica e/ou nuclear, por exemplo, por tingimento imuno-histológico com anticorpo específico para β -catenina ou por análise por *Western blot*. Igualmente, anticorpos monoclonais, que reconhecem de maneira específica β -catenina não fosforilada, isto é, β -catenina ativa, estão também comercialmente disponíveis e são particularmente úteis. Além disso, ensaios de repór-

20 ter são também eficazes, nos quais um gene repórter está ligado à jusante de uma seqüência de ligação de LEF-1/TCF e a capacidade de produzir o produto de gene repórter é usado como um marcador para o ensaio. Um plasmídeo contendo uma seqüência de ligação de LEF-1/TCF e um gene repórter para uso em tais ensaios pode ser comprado a partir de Upstate sob

25 o nome comercial de TOPflash.

Exemplos específicos de ativadores de sinalização Wnt incluem várias proteínas Wnt canônicas, inibidores de GSK-3 β e agonistas de Wnt. É também possível usar genes capazes de ativar a via de sinalização Wnt canônica, por exemplo, vários genes Wnt canônicos, assim como gente de β -

30 catenina ou seus mutantes ativos, que estejam modificados para eliminar a extremidade N-terminal ou para substituir sítios de fosforilação de GSK-3 β com aminoácidos não fosforilados. Alternativamente, a expressão de genes,

tais como Axina ou APC, que regulam à jusante a via de sinalização Wnt canônica, pode ser suprimida ou contida por ADNs sem sentido específicos ou ribozimas, ARNs sem sentido para interferência de ARN, compostos de baixo peso molecular e assim por diante. Deve-se observar que as seqüências de nucleotídeos de genes que codificam essas moléculas estão disponíveis através de bancos de dados de ADN públicos, tais como aqueles de NCBI, e os técnicos especializados no assunto serão capazes de obter, preparar e usar cADNs, siARNs e/ou ADNs sem sentido destes genes.

Proteínas Wnt canônicas, disponíveis para uso na presente invenção, são membros do grupo de proteínas da família Wnt e são definidas como substâncias que se ligam a receptores da família Fzd e inibem a fosforilação mediada por GSK-3 β de β -catenina para, por meio disso, promover a estabilização de β -catenina e sua capacidade de ativação de transcrição. Proteínas Wnt canônicas preferidas na presente invenção incluem, por exemplo, Wnt-1 (SEQ ID NO: 1), Wnt-3a (SEQ ID NO: 2), Wnt-5a (SEQ ID NO: 3) and Wnt-8a (SEQ ID NO: 4), assim como aquelas que compartilhem uma homologia de seqüências de aminoácidos de pelo menos 80%, mais preferivelmente, de pelo menos 90%, com estas proteínas, e que tenham a capacidade de ativar β -catenina.

Uma característica da presente invenção é que células ES ou outras células tronco pluripotentes são estimuladas, de maneira transiente, com um ativador de sinalização Wnt, e, embora o método de estímulo não esteja particularmente limitado, prefere-se um método de cultivo das células em meio suplementado com uma proteína Wnt canônica, por exemplo, uma proteína Wnt recombinante. Entretanto, qualquer outro método pode ser usado, que tenha os mesmos efeitos. Exemplos incluem um método de cultivo das células na presença de uma proteína Wnt canônica que tenha sido extraída e purificada a partir de tecidos vivos, um método de introdução de um vetor de expressão portando um gene que codifique uma proteína Wnt canônica nas próprias células tronco pluripotentes, um método de introdução de um tal vetor de expressão em células de suporte e de usar aquelas células transfectadas como células de cultivo conjunto, e um método usando um

sobrenadante de cultura ou outro produto celular daquelas células transfectadas e os similares, todos os quais são incluídos como parte da concretização para se adicionar uma proteína Wnt canônica ao meio, no método da presente invenção.

5 Na implementação da presente invenção, uma proteína Wnt canônica a ser usada e um gene que codifique a mesma são, de preferência, derivados a partir de animais da mesma espécie que aquela usada para derivar as células tronco pluripotentes, mas, aquelas derivadas a partir de animais de outras espécies também podem ser usadas. Por exemplo, quando
10 células ES de camundongo ou célula ES de macaco forem usadas na presente invenção, é possível usar proteína WNT-1 humana. Como proteínas Wnt recombinantes, estão comercialmente disponíveis Wnt-3a e Wnt-5a derivadas de camundongo, assim como WNT-7 derivada de ser humano a partir de R&D Systems, e WNT-1 derivada de ser humano está comercialmente
15 disponível a partir de Peptotech. Essas proteínas Wnt recombinantes são fáceis de usar. No caso de se usar essas proteínas recombinantes, o meio de cultura é removido de maneira estéril e substituído por meio fresco contendo uma proteína Wnt em uma concentração de 0,1 ng/mL a 500 ng/mL, de preferência, de 1 ng/mL a 200 ng/mL, mais preferivelmente, de 10 ng/mL
20 a 100 ng/mL, e o cultivo é continuado.

Em um caso no qual uma proteína Wnt desejada é feita por si mesma, é necessário introduzir e expressar um vetor de expressão carregando o gene de interesse em células animais (por exemplo, células L) e purificar uma proteína recombinante secretada para o sobrenadante do meio
25 de cultura, porque se sabe que proteínas Wnt não exercem sua atividade biológica a menos se modificada com ácido palmítico. Procedimentos detalhados para essa finalidade já são conhecidos (Willert et al., Nature 423:448, 2003; Kishida et al., Mol. Cell. Biol. 24:4487; <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>).

30 Deve-se observar que as seqüências de nucleotídeos de genes que codifiquem esses fatores estão disponíveis através de bancos de dados de ADN públicos, tais como aqueles de NCBI, e os técnicos especializados

no assunto serão capazes de obter e usar cADNs destes genes. Por exemplo, genes Wnt-3a e Wnt-8a já foram identificados em seres humanos e camundongos, e as seqüências de nucleotídeos de WNT-3A humana (SEQ ID NO: 5), Wnt-3a de camundongo (SEQ ID NO: 2), WNT-8A humana (SEQ ID NO: 6) e Wnt-8a de camundongo (SEQ ID NO: 4) estão registradas sob os Números de Acesso NM_033131, NM_009522, NM_031933 e NM_009290, respectivamente.

Inibidores de GSK-3 β de acordo com a presente invenção são definidos como substâncias que inibem a atividade de quinase de proteína de GSK-3 β (por exemplo, a capacidade de fosforilar β -catenina); e mais de várias dezenas de inibidores já são conhecidos (Martinez et al., Med. Res. Rev. 22:373, 2002; Meijer L et al., Trends Pharmacol. Sci. 25:471, 2004). Exemplos específicos incluem lítio; ácido valprótico; membros da família da benzazepinona Kenpaulona (9-bromo-7,12-di-hidroindolo [3,2-d] [1] benzazepin-6(5H)-ona) e Alsterpaulona (9-nitro-7,12-di-hidroindolo [3,2-d] [1] benzazepin-6(5H)-ona); derivados de indirubina 5-cloro-indirubina, indirubin-3'-monoxima e BIO (também chamado de inibidor IX de GSK-3 β ; 6-bromo-indirubin-3'-oxima); derivados de maleimida SB216763 (3-(2,4-dicloro-fenil)-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona) e SB415286 (3-[(3-cloro-4-hidróxi-fenil) amino]-4-(2-nitro-fenil)-1H-pirrol-2,5-diona); análogos de tiadiazolidinona (TDZD) TDZD-8 (também chamado de inibidor I de GSK-3 β ; 4-benzil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidina-3,5-diona) e OTDZT (também chamado de inibidor III de GSK-3 β ; 2,4-dibenzil-5-oxotiadiazolidina-3-tiona); um inibidor VII de GSK-3 β de composto de fenil- α -bromo-metil-cetona (4-dibromo-acetofenona); e um peptídeo fosforilado permeável à célula L803-mts (também chamado de inibidor de peptídeo de GSK-3 β ; Myr-N-GKEAPPAPPQSpP-NH₂). Esses compostos estão comercialmente disponíveis a partir de Calbiochem ou Biomol e são fáceis de usar, mas, isto não é uma limitação.

Em um caso no qual esses inibidores de GSK-3 β forem usados, a sua concentração ótima variará grandemente, dependendo de diferenças em suas propriedades de compostos. Por essa razão, é necessário determi-

nar a concentração ótima de cada composto a ser usado, e meio contendo um inibidor de GSK-3 β em uma concentração desejada é usado para o cultivo.

Por exemplo, no caso de BIO ou de SB216763, meio contendo o inibidor em uma concentração, de preferência, de 10 nmoles/L a 1 μ mol/L, mais preferivelmente, de 50 nmoles/L a 200 nmoles/L, é usado para o cultivo. No caso de inibidor VII de GSK-3 β , a sua concentração é, de preferência, de 2 μ moles/L a 100 μ moles/L, e, mais preferivelmente, de 5 μ moles/L a 20 μ moles/L. Igualmente, no caso de L803-mts, a sua concentração é, de preferência, de 5 μ moles/L a 500 μ moles/L, mais preferivelmente, de 20 μ moles/L a 200 μ moles/L, e, ainda mais preferivelmente, de 25 μ moles/L a 200 μ moles/L.

Em adição aos inibidores de GSK-3 β , drogas para uso na implementação da presente invenção podem ser compostos de baixo peso molecular, que promovam a ativação da via de sinalização Wnt canônica (agonistas de Wnt), incluindo compostos orgânicos ou inorgânicos e fragmentos de peptídeo. Exemplos preferidos incluem um derivado de aminopirimidina (2-amino-4-[3,4-(metilenodióxi) benzilamino]-6-(3-metóxi-fenil) pirimidina; Calbiochem) (Liu et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44:1987, 2005).

No caso de usar um tal agonista de Wnt, meio contendo o agonista de Wnt em uma concentração de 1 nmol/L a 1.000 nmoles/L, de preferência, de 10 nmoles/L a 500 nmoles/L, mais preferivelmente, de 50 nmoles/L a 200 nmoles/L é usado para o cultivo.

A determinação do momento, no qual as células tronco pluripotentes são tratadas com um ativador de sinalização Wnt é um requisito muito importante na implementação da presente invenção. A saber, em um momento não apropriado, um ativador de sinalização Wnt não mostra efeito de promoção, ou, ao invés disto, pode ter um efeito inibidor, sobre a capacidade de diferenciação de miocárdio de células tronco pluripotentes. Por meio de exemplo, quando células tronco pluripotentes são cultivadas durante cerca de 1 semana em um meio de cultura suplementado com um ativador de sinalização Wnt, partindo de imediatamente depois da indução de diferencia-

ção, a capacidade de diferenciação de miocárdio pode ser menor do que aquela observada no grupo (grupo não tratado) usando um meio de cultura sem conter ingrediente adicional.

O momento do tratamento com ativador de sinalização Wnt pode ser determinado com base nos padrões de expressão de vários genes Wnt canônicos durante a indução de diferenciação em células tronco pluripotentes para uso na implementação da presente invenção. Mais especificamente, células tronco pluripotentes podem ser induzidas a se diferenciarem de uma maneira rotineira, e mARNs podem ser extraídos a partir das amostras coletadas periodicamente para analisar os níveis de expressão de vários genes Wnt canônicos, por técnicas padrão, tais como RT-PCR. As amostras são coletadas, de preferência, a cada 24 horas, mais preferivelmente, a cada 12 horas, durante o período de tempo entre a iniciação da cultura para indução de diferenciação e o aparecimento de cardiomiócitos (que batem), por exemplo, cerca de 6 a 14 dias para células ES de camundongo, macaco e seres humanos. Embora um único gene Wnt canônico possa ser usado para a análise, de preferência, dois ou mais, mais preferivelmente, três ou mais genes são desejados.

Em células ES e outras células tronco pluripotentes, a expressão de vários genes Wnt canônicos é, em geral, baixa tanto no estado não diferenciado quanto imediatamente depois da indução de diferenciação, mas, a sua expressão é prontamente elevada vários dias depois da indução de diferenciação (Exemplo 1). Dessa maneira, um instante de tempo no qual os níveis de expressão de genes Wnt canônicos estejam significativamente elevados, depois da indução da diferenciação, quando comparados às células tronco pluripotentes não diferenciadas, é definido como o "período de elevada expressão de gene Wnt". Elevação significativa em expressão de gene pode ser determinada por testes estatísticos comumente usados, tais como teste t de Student (nível de significância: 5%). O nível de significância usado como um critério nesse caso é, de preferência, de 5%, mais preferivelmente, de 1%. Alternativamente, quando a expressão de gene Wnt canônico medida se elevar rapidamente dentro de vários dias, depois da indução de dife-

renciação, e, então, desaparece dentro de vários dias, isto é, quando genes Wnt canônicos exibem elevada expressão somente durante um curto período, o instante de tempo no qual eles alcançam níveis de expressão máximos pode ser definido como o período de elevada expressão de gene Wnt.

5 Quando células tronco pluripotentes forem cultivadas em meio contendo um antagonista de BMP, partindo de 2 ou 3 dias antes da indução de diferenciação e/ou partindo de imediatamente depois da indução de diferenciação, sabe-se que sua capacidade de diferenciação de miocárdio é aumentada de maneira significativa (WO2005/033298; Yuasa et al., Nat. Biotechnol. 23:607, 2005). Nesse caso, constatou-se que os vários genes Wnt canônicos acima exibem elevada expressão durante o cultivo. Essa constatação é útil na determinação do período de elevada expressão de gene Wnt canônico na presente invenção, e é desejável usar meio contendo um antagonista de BMP para cultivo na determinação do período de elevada expressão. Um antagonista de BMP se refere a uma substância que se ligue a uma molécula de BMP (por exemplo, BMP-2, BMP-4, BMP-7) para inibir a sinalização BMP, e exemplos incluem Noguina, Cordina e DAN. Essas substâncias, que podem ser adicionadas ao meio, podem ser compradas, por exemplo, a partir de R&D Systems.

20 Na presente invenção, células tronco pluripotentes são cultivadas em meio não contendo qualquer ativador de sinalização Wnt durante o período de tempo entre imediatamente depois da iniciação do cultivo para a indução de diferenciação de miocárdio e 24 horas antes do período de elevada expressão de gene Wnt, determinado conforme descrito acima. Então, as células são ulteriormente cultivadas em meio contendo um ativador de sinalização Wnt durante 24 a 96 horas, de preferência, 48 a 72 horas, partindo de um instante de tempo de 24 a 0 horas antes, de preferência, de 24 horas antes do período de elevada expressão de gene Wnt, determinado conforme descrito acima. Por exemplo, em um caso de células ES de camundongo cultivadas para a indução de diferenciação de miocárdio, a expressão dos genes Wnt canônicos típicos Wnt-3, Wnt-3a e Wnt-8a é extremamente baixa tanto em um estado não diferenciado quanto imediatamente

antes da indução de diferenciação, porém, estes genes exibem forte expressão entre 72 e 96 horas depois da indução de diferenciação (Exemplo 1). Por essa razão, em um caso no qual células ES de camundongo são usadas no método da presente invenção, o período de elevada expressão de gene Wnt canônico é determinado como sendo de 72 horas depois da indução de diferenciação, e, portanto, as células são cultivadas em meio não contendo qualquer ativador de sinalização Wnt até 48 horas depois da iniciação da indução de diferenciação. Então, as células são ulteriormente cultivadas em meio contendo um ativador de sinalização Wnt durante 24 a 96 horas, de preferência, durante 48 a 72 horas, partindo-se de 48 horas depois da iniciação da indução de diferenciação. Deve-se observar que o período de tempo (horas) durante o qual as células são tratadas com um ativador de sinalização Wnt pode ser ajustado para um período (horas) ótimo, conforme apropriado, dependendo de diferenças de condições, tais como a espécie de animal a partir da qual as células a serem usadas são derivadas, o tipo de linhagem de células a ser usado e/ou o tipo de ativador de sinalização Wnt a ser usado, e um tal período (horas) pode ser determinado com base no período de elevada expressão de gene Wnt canônico obtido pelo método acima para a determinação do momento do tratamento com ativador de sinalização Wnt. Por exemplo, no caso de células ES de macaco (sagüi comum), o gene Wnt-3 exibe forte expressão entre 72 e 120 horas depois da indução de diferenciação (Exemplo 5). Igualmente, no caso de células ES humanas, o gene Wnt-3a exibe expressão com um pico em torno de 72 horas depois da indução de diferenciação (Beqqali et al., Stem Cells 24:1956, 2006).

Cardiomiócitos derivados de células ES ou de outras células tronco pluripotentes, pelo método mencionado anteriormente, podem ser ulteriormente coletadas, isoladas e purificadas por métodos conhecidos, para se obter, de maneira eficiente, grandes quantidades de cardiomiócitos altamente puros (cardiomiócitos preparados de acordo com a presente invenção).

Qualquer método conhecido de isolamento e purificação celular pode ser usado como o método de purificação dos cardiomiócitos, e exem-

plos específicos incluem citometria por escoamento, contas magnéticas, ca-
peamento (em Inglês: *panning*) e outros métodos envolvendo reações anti-
geno-anticorpos (ver "Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third
Edition" (Acad. Press, 1993); "Antibody Engineering: A Practical Approach"
5 (IRL Press at Oxford University Press, 1996), assim como o fracionamento
celular por centrifugação por gradiente de densidade usando um veículo, tal
como sacarose, Percoll ou similares. Outro método de seleção de cardiomi-
ócitos é introduzir primeiro de maneira artificial uma modificação nos genes
das células ES ou outras células tronco pluripotentes, tornando-as resisten-
tes a drogas ou capazes de expressão de proteína ectópica, e coletar as
10 células tendo a morfologia de cardiomiócitos. Por exemplo, por introdução de
um cassete de genes capaz de expressar um gene de resistência à neomici-
na (G418) sob o controle do promotor de cadeia pesada de α -miosina em
células ES de camundongo, Fields e seus co-pesquisadores foram bem su-
15 cedidos na construção de um sistema, no qual células ES foram diferencia-
das em cardiomiócitos e somente aquelas células que expressaram o gene
de cadeia pesada de α -miosina puderam sobreviver em meio ao qual G418
tinha sido adicionado, e 99% ou mais das células selecionadas como células
resistentes a G418 por esse método foram confirmadas como sendo cardio-
20 miócitos (patente norte-americana de número 6.015.671; Klug et al., J. Clin.
Invest. 98: 216, 1996). Como outro exemplo, um método baseado no teor
mitocondrial mais elevado em cardiomiócitos do que de outras células é
também eficaz, no qual populações de células ricas em mitocôndrias, isto é,
cardiomócitos são coletados de maneira específica usando um corante fluo-
25 rescente seletivo de mitocôndrias ou um reagente sensível ao potencial de
membrana de mitocôndrias (WO2006/022377). Ainda como outro exemplo,
um método baseado em propriedades metabólicas específicas de cardiomi-
ócitos é também preferido, no qual cardiomiócitos são purificados de mane-
ira específica sob condições de baixa glicose por adição de ácido láctico ou de
30 um aminoácido, tal como ácido aspártico (Pedido de Patente Japonês de
número 2006-23770).

Cardiomiócitos preparados de acordo com a presente invenção

são úteis em avaliações farmacológicas e em avaliações de atividade de várias substâncias bioativas (por exemplo, drogas) e de novos produtos de gene de função desconhecida. Por exemplo, eles podem ser usados para selecionar substâncias e drogas envolvidas no controle da diferenciação em cardiomiócitos a partir de células ES e de outras células tronco pluripotentes, para selecionar substâncias e drogas envolvidas na regulação da função de cardiomiócitos e para selecionar substâncias e drogas que sejam tóxicas ou inibidoras em face de cardiomiócitos. Em particular, existem atualmente muito poucos métodos de seleção usando cardiomiócitos humanos, e os cardiomiócitos preparados de acordo com a presente invenção fornece uma fonte útil de células para a implementação de tais métodos de seleção. De outro modo, um kit de avaliação compreendendo cardiomiócitos preparados de acordo com a presente invenção é também útil para tal seleção.

Substâncias de teste a serem selecionadas podem incluir qualquer uma que seja adicionada à cultura, tais como compostos de baixo peso molecular, compostos de elevado peso molecular, compostos orgânicos, compostos inorgânicos, proteínas, peptídeos, genes, vírus, células, fluidos de culturas de células, fluidos de culturas microbianas e os similares. Métodos eficientes de introdução de genes em sistemas de cultura incluem métodos de adição a sistemas de cultura usando retrovírus, edenovírus ou outros vetores de vírus, assim como métodos de adição depois de inserção em lipossomas e outros construtos artificiais.

A substância de teste pode ser avaliada por medição da eficiência da indução de diferenciação a partir de células ES ou de outras células tronco pluripotentes em cardiomiócitos, ou as mudanças qualitativas ou quantitativas em funções celulares de miocárdio. Por exemplo, a eficiência de indução de diferenciação de miocárdio de uma substância de teste pode ser medida por uso de meios bioquímicos ou imunoquímicos para detectar a expressão de vários marcadores específicos de cardiomiócitos em células tronco pluripotentes, cultivadas usando o método da presente invenção, depois que elas tenham sido cultivadas durante 5 a 15 ou, de preferência, 7 a 12 dias. Não há limites particulares nos meios bioquímicos ou imunoquími-

cos, mas, de preferência, um método imunoquímico, tal como tingimento imuno-histoquímico ou imunoelektroforese pode ser usado. Anticorpos policlonais específicos de marcador ou anticorpos monoclonais que se ligam aos cardiomiócitos podem ser usados nesses métodos. Anticorpos que têm
5 por alvo marcadores específicos individuais estão comercialmente disponíveis e podem ser facilmente usados. Exemplos de marcadores específicos de cardiomiócitos incluem cadeias pesada e leve de miosina, α -actinina, troponina I, ANP, GATA-4, Nkx2.5, MEF-2c e os similares.

A sobrevivência de células de miocárdio é um exemplo de uma
10 função de célula de miocárdio que possa ser usada como um marcador para a avaliação de uma substância de teste. De maneira específica, a morte celular (apoptose) pode ser induzida por semeadura de cardiomiócitos preparados pelo método de acordo com a presente invenção sobre uma placa de cultura até uma densidade de células apropriada e cultivá-las em meio livre
15 de soro, e, neste caso, uma quantidade adequada da substância de teste pode ser adicionada ao meio e a taxa de sobrevivência ou taxa de morte de cardiomiócitos podem ser medidas. A taxa de sobrevivência ou a taxa de morte dos cardiomiócitos podem ser medidas por observação macroscópica usando a incorporação de um corante, tal como Azul de Tripano como o
20 marcador, por um método usando atividade de desidrogenase (redução de atividade) como o marcador, ou por um método usando expressão de anexina V ou atividade de caspase, que sejam específicas para apoptose de células, como o marcador. Kits explorando esses mecanismos estão disponíveis a partir de muitos fabricantes, incluindo Sigma, Clonotech e Promega, e são
25 fáceis de usar.

Porque uma substância ou droga, obtidas por um tal método de seleção, atua para induzir a diferenciação em cardiomiócitos e regular as suas funções, elas podem ser usadas, por exemplo, como uma droga preventiva ou terapêutica para condições do coração, incluindo infarto do miocárdio, doença do coração isquêmica, falência congestiva do coração, cardiomiopatia hipertrófica, cardiomiopatia dilatante, miocardite, falência crônica
30 do coração e os similares. Esses compostos podem ser compostos novos ou

compostos conhecidos.

Além disso, cardiomiócitos preparados de acordo com a presente invenção podem ser usados como drogas de regeneração do miocárdio ou drogas para o tratamento de doenças do coração. Exemplos de doenças do coração incluem infarto do miocárdio, doença do coração isquêmica, falência congestiva do coração, cardiomiopatia hipertrófica, cardiomiopatia dilatante, miocardite, falência crônica do coração e os similares. Quando usados como drogas de regeneração do miocárdio ou drogas para o tratamento de doenças do coração, os cardiomiócitos preparados de acordo com a presente invenção podem ser incluídos em qualquer forma, tanto quanto a pureza seja elevada, tais como células suspensas no meio ou outro veículo aquoso, células envolvidas em um substrato biodegradável ou outro suporte, ou células feitas em uma folha de miocárdio de camada única ou de múltiplas camadas (Shimizu et al., *Circ. Res.* 90:e40, 2002).

Embora não particularmente limitado a estes, métodos para o transporte da droga terapêutica anteriormente mencionada para um sítio de lesão incluem injeção direta no coração via um peito aberto ou seringa, métodos de transplante via uma incisão cirúrgica no coração e métodos de transplante via os vasos sanguíneos usando um cateter (Murry et al., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 67:519, 2002; Menasche, *Ann. Thorac. Surg.* 75:S20, 2003; Dowell et al., *Cardiovasc. Res.* 58:336, 2003). Efeitos terapêuticos extremamente bons têm sido relatados quando cardiomiócitos coletados a partir de um coração fetal foram transplantadas por tais métodos para os corações de animais com lesão no coração (Menasche, *Ann. Thorac. Surg.* 75:S20, 2003; Reffelmann et al., *Heart Fail. Rev.* 8:201, 2003). Cardiomiócitos derivados a partir de células ES têm características extremamente similares àquelas de cardiomiócitos derivados a partir de corações fetais (Maltsev et al., *Mech. Dev.* 44:41, 1993; *Circ. Res.* 75:233, 1994; Doevendans et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32:839, 2000). Além disso, uma taxa de assimilação extremamente elevada equivalente àquela alcançada com transplante do miocárdio fetal tem sido confirmada em experimentos com animais, nos quais cardiomiócitos derivados a partir de células ES foram re-

almente transplantadas em corações adultos (Klug et al., J. Clin. Invest. 98:216, 1996; Laflamme et al., Am. J. Pathol. 167:663). Conseqüentemente, espera-se que transplante suplementar de cardiomiócitos preparados de acordo com a presente invenção, para tecido de coração doente, deva estimular funções de coração aperfeiçoadas, nos casos das doenças do coração mencionadas anteriormente, que se origina de lesão ou perda de células do coração.

EXEMPLOS

A presente invenção é explicada, em maiores detalhes abaixo, usando exemplos.

Exemplo 1: Estudo sobre os padrões de expressão de vários genes Wnt durante a indução de diferenciação em células ES (1)

Vários genes Wnt foram estudados em relação a sua expressão durante a diferenciação em células ES de camundongos. Para uso em experimentos, células ES de camundongos foram passadas e mantidas em um estado não diferenciado de acordo com os métodos conforme descrito em "Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual" (Hogan et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994) e "Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols" (Turksen ed., Humana Press, 2002) por uso meio Knockout-DMEM (Invitrogen) contendo 20% de soro bovino fetal, 2 mmol/L de L-glutamina e 0,1 mmol/L de 2-mercapto-etanol (a que se refere, doravante, como ESM), suplementado com 1.000 U/mL LIF (ESGRO; Chemicon). Às células ES passadas sob essas condições refere-se, doravante, como "células ES passadas sob condições de cultivo ordinárias". As células ES de camundongo usadas nos experimentos seguintes eram células D3, células R1 e células 129SV (compradas a partir de Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Japão), mas, em geral, não houve diferenças nos resultados experimentais entre essas linhagens de células ES. A menos se indicado de outra maneira, dados experimentais obtidos com a linhagem de células D3 são mostrados abaixo. Deve-se observar que células ES de camundongo foram usadas nos experimentos dos Exemplos 1 a 4.

Células ES passadas sob condições de cultivo ordinárias foram

lavadas duas vezes com salina tamponada com fosfato (a que se refere, doravante, como PBS) e tratadas com solução de tripsina à 0,25% contendo 1 mmol/L de EDTA para se obter células únicas, que foram, então, suspensas em ESM. A menos se indicado de outra maneira, as mesmas condições foram usadas no descolamento das células ES de placas para uso na indução de diferenciação e outros experimentos.

Cultura para indução de diferenciação de células ES em cardiomiócitos ou neurônios foi realizada de uma maneira rotineira, como se segue. Células ES foram suspensas em meio livre de LIF, e a suspensão resultante foi semeada em 500 células/50 μ L por cavidade de uma placa de cultura de 96 cavidades comercialmente disponível para formação esferóide (Sumilon Celltight Spheroid; Sumitomo Bakelite Co., Ltd., Japão). Sob essas condições experimentais, as células ES começaram a se agregar e a formar EBs imediatamente depois do cultivo em suspensão, alguns EBs começaram a exibir batimento espontâneo cerca de 7 ou 8 dias depois do cultivo de agregação flutuante (indução de diferenciação), indicando que pelo menos parte dos EBs se diferenciaram em cardiomiócitos.

Nesse experimento, alguns dos grupos experimentais receberam adição de uma proteína de Cordina ou DAN recombinante comercialmente disponível (15 ng/mL; ambos comprados de R&D Systems) ao meio em 3 dias antes e imediatamente depois da indução de diferenciação. Quando tratadas de maneira transiente com um antagonista de BMP desta maneira, sabe-se que células ES intensificam sua capacidade de diferenciação de miocárdio (WO2005-033298; Yuasa et al., Nat. Biotechnol. 23:607, 2005). Ao tratamento de células em meio suplementado com um antagonista de BMP, tal como proteína de Cordina ou proteína de DAN, refere-se doravante, como “tratamento com antagonista de BMP”.

Os EBs assim preparados foram coletados periodicamente, e o ARN total foi preparado com um mini kit RNeasy (Qiagen), seguido por tratamento com ADNase. cADN foi sintetizado a partir do ARN total tratado com ADNase (1 μ g) usando um SuperScript™ First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen). A análise de expressão de gene foi realizada com

um ABI PRISM 7700 (PE Applied Biosystems) por uso de um sistema de quantificação por reação em cadeia com polimerase (PCR) em tempo real, com iniciadores Lux, para examinar o nível de expressão de cada gene. A quantificação com PCR em tempo real foi realizada por uso do cADN acima como um molde e usando Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen), de acordo com as instruções anexadas a ele.

Iniciadores Lux para detecção de vários genes Wnt foram projetados usando programa de computador de projeto de iniciador (D-LUXTM Designer; Invitrogen) com base na informação de seqüência de nucleotídeos dos genes. As seqüências de nucleotídeos dos iniciadores Lux usados para a detecção de vários transcritos de gene Wnt são como mostrados abaixo.

Wnt-3

(Avante) 5'-CAACAGTAGCAAGGAGCATGGACTGTTG-3' (SEQ ID NO: 7)
 15 (Reverso) 5'-GGCTGGGTCCAGGTCGTTTA-3' (SEQ ID NO: 8)

Wnt-3a

(Avante) 5'-GACAAACCGGGAGTCAGCCTTTGTC-3' (SEQ ID NO: 9)
 (Reverso) 5'-TGCTGCACCCACAGATAGCA-3' (SEQ ID NO: 10)

Wnt-8a

20 (Reverso) 5'-GTACATGCGCTCTGCTGCCATCATGTAC-3' (SEQ ID NO: 11)
 (Avante) 5'-GACTCGTCACAGCCGCAGTT-3' (SEQ ID NO: 12)

A Figura 1 mostra um exemplo dos experimentos realizados conforme descrito acima. Os genes Wnt foram examinados em relação à sua expressão entre 24 horas (1 dia) e 168 horas (7 dias) depois da indução de diferenciação em células ES, indicando que os genes Wnt-3, Wnt-3a e Wnt-8a mostraram elevações significativas em suas expressão. Cada um desses genes Wnt mostraram um pico de forte expressão entre 72 e 96 horas depois da indução de diferenciação, e sua expressão foi, então, diminuída de maneira significativa a partir de 120 horas depois da indução de diferenciação. Portanto, nessas células ES, o período de elevada expressão de gene Wnt pode ser determinado como sendo 72 horas depois da indução de diferenciação.

Os grupos tratados com um antagonista de BMP, tal como proteína de Cordina ou proteína de DAN, mostraram fortes elevações de expressão de genes Wnt em 72 horas depois da indução de diferenciação, como no caso do grupo não tratado, e constatou-se que os níveis de expressão dos genes Wnt são significativamente mais elevados do que aqueles do grupo não tratado. Esses resultados indicam que o tratamento com antagonista de BMP é um método capaz de se determinar mais precisamente o período de elevada expressão de gene Wnt durante a diferenciação de células ES.

5
10 Exemplo 2: Efeito de intensificação de tratamento com proteína Wnt recombinante sobre a aparência de cardiomiócitos derivados a partir de células ES (1)

No estágio inicial de diferenciação em células ES, elevações transientes em expressão de vários genes Wnt foram observados antes do aparecimento de cardiomiócitos. Então, células ES nesse estágio foram tratadas com proteínas Wnt recombinantes para estudar o efeito de indução de diferenciação em miocárdio das proteínas. Indução de diferenciação de células ES foi realizada da mesma maneira como usada no Exemplo 1, exceto que alguns do grupos experimentais foram cultivados em meio contendo uma proteína recombinante comercialmente disponível de WNT-1 (Peprotech), Wnt-3a (R&D Systems) ou Wnt-5a (R&D Systems). Ao tratamento de células ES em meio suplementado com uma proteína recombinante de Wnt canônica, tal como WNT-1, refere-se, doravante, como “tratamento Wnt”.

25 A taxa de aparecimento de EBs exibindo batimento espontâneo foi investigada periodicamente como um índice útil da diferenciação e do desenvolvimento de cardiomiócitos a partir de células ES. No grupo não tratado, a taxa de aparecimento de EBs que batem estava em torno de 20% em 13 dias depois do cultivo em suspensão, enquanto que, no grupo recebendo tratamento Wnt durante 48 horas (2 dias) entre 48 e 96 horas depois da indução de diferenciação (Wnt^{48-96h}), assim como o grupo recebendo tratamento Wnt durante 72 horas (3 dias) entre 48 e 120 horas depois da indução de diferenciação (Wnt^{48-120h}), o batimento foi observado em uma percentagem significativamente elevada de EBs (Figura 2A e 2B). O efeito de trata-

mento Wnt foi tão elevado quando comparável àquele de tratamento com antagonista de BMP ("Cordina" na figura).

5 Ao contrário, no grupo recebendo tratamento Wnt durante as primeiras 48, 72, 96 ou 120 horas (2, 3, 4 ou 5 dias) depois da indução de diferenciação (Wnt^{-48h}, Wnt^{-72h}, Wnt^{-96h} ou Wnt^{-120h}, respectivamente), assim como o grupo recebendo tratamento Wnt a partir de 120 ou 144 horas (5 ou 6 dias) depois da indução de diferenciação (Wnt^{120h~} ou Wnt^{144h~}), EBs com capacidade de batimento apareceram no mesmo nível que no grupo não tratado. Além disso, em EBs a partir do grupo não tratado e de outros grupos com uma baixa percentagem de EBs que batem, o batimento estava limitado a certas regiões restritas dos EBs, enquanto que foi constatado que EBs a partir dos grupos Wnt^{48-96h} e Wnt^{48-120h} exibem batimento ao longo de virtualmente todas as regiões de sua camada de superfície, como no caso de EBs tratados com Cordina. A saber, mesmo quando células ES foram cultivadas em meio contendo uma proteína Wnt durante o período de tempo entre imediatamente depois da indução de diferenciação e 24 horas antes do período exibindo elevada expressão de gene Wnt (isto é, 72 horas depois da iniciação da indução de diferenciação), não houve efeito significativo sobre indução de diferenciação em miocárdio).

20 Ao contrário, quando células ES foram cultivadas em meio contendo uma proteína Wnt recombinante durante 48 horas (2 dias) ou 72 horas (3 dias) partindo de 24 horas antes do período exibindo elevada expressão de gene Wnt (isto é, 72 horas depois iniciação de indução de diferenciação), houve um efeito de intensificação significativo sobre a capacidade de diferenciação em miocárdio.

25 Esses resultados indicam que, embora o tratamento Wnt induziu de maneira significativa a diferenciação em miocárdio a partir de células ES, seu efeito foi observado somente durante um período limitado durante a indução de diferenciação. Nos experimentos seguintes, o termo "tratamento Wnt" é usado a significar tratamento Wnt durante 48 horas (2 dias) entre 48 e 96 horas depois de iniciação de indução de diferenciação ou durante 72 horas (3 dias) entre 48 e 120 horas depois de iniciação da indução de dife-

renciação, a menos se indicado de outra maneira.

Estudo ulteriores foram realizados em “tratamento Wnt” para investigar como diferenças na concentração de proteínas Wnt recombinantes adicionadas afetariam a capacidade de diferenciação em miocárdio. Por meio de exemplo, no caso de usar Wnt-3a, Wnt-5a e WNT-1, eles exibiram quase a mesma dependência de concentração, e a taxa de aparecimento de EBs que batem era significativamente mais elevada do que no grupo não tratado, quando as proteínas recombinantes foram adicionadas em concentrações de 1 ng/mL a 100 ng/mL. Em particular, uma ocorrência muito boa de EBs que batem foi obtida através da adição das proteínas Wnt em concentrações de 10 ng/mL a 50 ng/mL.

Exemplo 3: Propriedades de cardiomiócitos derivados a partir de células ES tratadas com Wnt

Conforme mostrado no Exemplo 2, o batimento de EBs preparados a partir de células ES foi aumentado de maneira significativa por tratamento com Wnt, e para confirmar que as células que batem nesses EBs eram cardiomiócitos, estudos ulteriores foram realizados para investigar a expressão de genes e a produção de proteínas de várias moléculas de marcador específico de miocárdio. Da mesma maneira como usado no Exemplo 2, células ES foram induzidas a se diferenciarem e os EBs resultantes foram coletados em 10 dias depois de indução de diferenciação para preparar cADN. A quantificação por PCR em tempo real foi realizada pelo método com sonda TaqMan, isto é, por uso do cADN acima (1 µL) como um molde e usando um TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Applied Biosystems) de acordo com as instruções anexadas a ele. Sondas TaqMan para detecção de vários genes foram projetadas usando programa de computador de projeto de iniciador (ABI PRISM Primer Express) com base na informação de seqüências de nucleotídeos dos genes. As seqüências de nucleotídeos dos iniciadores e sondas TaqMan usadas para a detecção de transcritos de GATA-4, Nkx-2.5, MLC-2a, MLC-2v e GAPDH são conforme mostrados abaixo.

GATA-4

(Avante) 5'-ACGGAAGCCCAAGAACCTGA-3' (SEQ ID NO: 13),

(Reverso) 5'-CATTGCTGGAGTTACCGCTG-3' (SEQ ID NO: 14),
 (Sonda TaqMan) 5'-TAAATCTAA GACGCCAGCAGGTCCTGCTG-3' (SEQ
 ID NO: 15);

Nkx-2.5

- 5 (Avante) 5'-TGACCCAGCCAAAGACCCT-3' (SEQ ID NO: 16),
 (Reverso) 5'-CCATCCGTCTCGGCTTTGT-3' (SEQ ID NO: 17),
 (Sonda TaqMan) 5'-CGGATAAAAAAGA GCTGTGCGCGC-3' (SEQ ID
 NO: 18);

MLC-2a

- 10 (Avante) 5'-CCAGGCAGACAAGTTCTCTCCT-3' (SEQ ID NO: 19),
 (Reverso) 5'-CTTGTAGTCAATGTTGCCGGC-3' (SEQ ID NO: 20),
 (Sonda TaqMan) 5'-CAACTGTTTGCGCTGACACCCATGGA-3' (SEQ ID
 NO: 21);

MLC-2v

- 15 (Avante) 5'-GCAGAGAGGTTCTCCAAAGAGG-3' (SEQ ID NO: 22),
 (Reverso) 5'-AAGATTGCCGGTAACGTCAGG-3' (SEQ ID NO: 23),
 (Sonda TaqMan) 5'-ATCGACCAGATGTTTCGCAGCCTTTCC-3' (SEQ ID
 NO: 24)

GAPDH

- 20 (Avante) 5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3' (SEQ ID NO: 25),
 (Reverso) 5'-GGATGCAGGGATGATGTTTC-3' (SEQ ID NO: 26),
 (Sonda TaqMan) 5'-CAGAAGACTGTG GATGGCCCCTC-3' (SEQ ID NO:
 27)

Quando comparados ao grupo não tratado, EBs no grupo tratado
 25 com Wnt (grupo Wnt^{48-120h}) em 10 dias depois da indução da diferenciação
 mostrou expressão significativamente mais forte para genes GATA-4, Nkx-
 2.5, MLC-2a e MLC-2v (Figura 3), assim como genes α MHC e β MHC, cada
 um dos quais genes é conhecido como um marcador de cardiomiócito típico.

Ao contrário, nos grupos Wnt^{-48h}, Wnt^{-120h} and Wnt^{144h-} exibindo
 30 uma baixa taxa de aparecimento de EBs que batem, os níveis de expressão
 dos genes de marcador eram quase os mesmos que no grupo não tratado, e
 substancialmente as mesmas tendências foram observadas para a taxa de

aparecimento de EBs que batem e os níveis de expressão de vários genes de marcador de miocárdio.

Subseqüentemente, o tingimento imuno-histoquímico foi realizado para confirmar que células que batiam desenvolvidas em EBs, a partir dos grupos tratados com Wnt, produziram proteínas de marcador específicas de cardiomiócitos. EBs no grupo tratado com Wnt (grupo (Wnt^{48~120h}) em 10 dias depois da indução de diferenciação foram recém-envolvidas em um composto para a preparação de soluções congeladas (OCT Compound, Sakura Finetek USA Inc.) e, então, congeladas com nitrogênio líquido. As amostras congeladas foram seccionadas em 6 µm de espessura e fixadas em lâminas de vidro. Essas seções congeladas foram reagidas com anticorpo anti-miosina sarcomérica (MF20; American Type Culture Collection), anticorpos anti-GATA-4 (C-20; Santa Cruz) ou anticorpos anti-Nkx-2.5 (N-19; Santa Cruz), como um anticorpo primário e, então, reagidas com um anticorpo secundário marcado com peroxidase de rábano silvestre (Bio-RAD), e finalmente submetida a uma reação de cor com solução de substrato de ACE (3-amino-9-etil-carbazol) (Nichirei Corporation, Japão) e observado sob um microscópio óptico.

Os resultados obtidos são mostrados na Figura 4. No grupo não tratado, células positivas para proteínas de marcador específico de cardiomiócitos de miosina sarcomérica ("MHC" na figura), Nkx-2.5 e GATA-4 foram observadas em um número muito limitado de EBs. Ao contrário, no grupo tratado com Wnt, constatou-se que a grande maioria de células constituintes de EB é positiva para as proteínas de marcador e foram confirmadas a formar cardiosferas, como no caso do grupo tratado com antagonista de BMP (DAN). Esses resultados provaram que células que batem derivadas a partir de células ES tratadas com Wnt eram cardiomiócitos, e também indicaram que esse método promoveu fortemente a diferenciação em cardiomiócitos e o desenvolvimento em EBs.

Exemplo 4: Efeito de intensificação de ativador de β -catenina sobre o aparecimento de cardiomiócitos derivados a partir de células ES

Sabe-se que o tratamento com proteína Wnt canônica acima

limita a ação de GSK3 β dentro de células e, por meio disso, promovem a estabilização de β -catenina e sua capacidade de ativação de transcrição. Então, estudos ulteriores foram realizados para confirmar que o tratamento com várias drogas capazes de promover a estabilização de β -catenina e sua capacidade de ativação de transcrição produziram um efeito de indução de diferenciação em miocárdio em células ES, como no caso de tratamento com Wnt. Como drogas capazes de promover a estabilização de β -catenina e sua capacidade de ativação de transcrição, foram usados os seguintes cinco compostos comercialmente disponíveis: inibidores de GSK3 β BIO (Calbiochem), inibidor VII de GSK3 β (Calbiochem), inibidor de peptídeo de GSK3 β permeável à célula (L803-mts; Calbiochem) e SB216763 (Biomol), assim como um agonista de Wnt (Calbiochem), que promova a capacidade de ativação de transcrição de β -catenina sem inibição de GSK3 β . Células ES foram induzidas a se diferenciarem da mesma maneira como usadas nos Exemplos acima, e cultivadas em meio contendo os compostos acima durante o período de tempo entre 48 e 120 horas (3 e 5 dias) depois da indução de diferenciação, como no caso de proteínas Wnt recombinantes.

Conforme mostrado na Figura 5, os resultados confirmaram que os grupos tratados com os compostos acima mostraram, em suas concentrações ótimas, um forte efeito de indução de diferenciação em miocárdio comparável a ou maior do que aquele dos grupos tratados com proteína Wnt recombinante. Da mesma maneira como usados no Exemplo 3, EBs tratados com esses compostos foram estudados em relação a sua expressão de genes de marcador de miocárdio e proteínas de marcador de miocárdio, indicando que eles mostraram um efeito de elevação significativamente mais elevado sobre a expressão de gene e de proteína do que o grupo não tratado, como no caso dos grupos tratados com proteína Wnt recombinante.

Exemplo 5: Estudo sobre padrões de expressão de genes Wnt durante a indução de diferenciação em células ES (2)

Células ES derivadas a partir de sagüi comum, um tipo de macaco (a que se refere, doravante, como "células cmES") foram usados para estudar a expressão de gene Wnt durante a sua diferenciação. Para uso em

experimentos, células cmES foram passadas e mantidas em um estado não diferenciado em fibroblastos embrionários de camundongo primários, tratados com mitomicina, que tinham sido semeados como células alimentadoras, por uso de meio Knockout-DMEM (Invitrogen) contendo 20% de Knockout Serum Replacement (Invitrogen), 0,1 mmoles/L de solução de aminoácidos não essencial MEM, 1 mmol/L de L-glutamina e 0,1 mmol/L de 2-mercapto-etanol (a que se refere, doravante, como “meio cmES”), suplementado com 10 ng/mL de LIF recombinante (Alomone Labs) e 10 ng/mL de fator de crescimento de fibroblasto recombinante (Invitrogen).

10 O cultivo para indução de diferenciação em células cmES foi realizado de uma maneira rotineira, como se segue. Células cmES foram lavadas com PBS e, então, tratadas com uma solução de dissociação de células comercialmente disponível para células ES de primatas (ReproCELL) à 37°C durante 5 minutos, para coletar uma suspensão celular contendo a-

15 gregados de células cmES. A seguir, para separar as células cmES das células alimentadoras, a suspensão de células foi passada através de uma malha de 100 µm de tamanho de poro e a fração de células passadas foi, então, passada através de uma malha de 40 µm de tamanho de poro, para coletar a fração não passada permanecendo sobre a malha. Essa fração não

20 passada contendo agregados de células cmES foi ulteriormente semeada em uma placa de cultura comercialmente disponível com elevada fixação de células (Primaria; Becton Dickinson) e cultivadas durante 30 minutos, seguido por coleção de agregados celulares flutuando no meio sem aderir à placa. Os agregados de células cmES assim obtidos foram induzidos a se diferen-

25 ciar em EBs por cultivo em uma placa de cultura não adesiva às células comercialmente disponível (HydroCell; CellSeed) preenchida com meio cmES, enquanto se evita que os agregados celulares entrem em contato com e adiram umas com as outras.

Os EBs assim preparados foram coletados periodicamente, e o

30 ARN total foi preparado com um mini kit RNeasy (Qiagen). cADN foi, então, sintetizado com transcriptase reversa e analisado por PCR para detectar a expressão de gene Wnt-3 de sagüi comum (cmWnt-3) e β -actina

(cm β Actina) servindo como um controle endógeno. Os iniciadores usados para a detecção são conforme mostrado abaixo.

cmWnt-3

(Avante) 5'-GAGGTGAAGACCTGCTGGTGGGC-3' (SEQ ID NO: 28)

5 (Reverso) 5'-GTTGGGCTCACAAAAGTTGG-3' (SEQ ID NO: 29)

cm β Actina

(Avante) 5'-TCCTGACCCTGAAGTACCCC-3' (SEQ ID NO: 30)

(Reverso) 5'-GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC-3' (SEQ ID NO: 31)

A Figura 6 mostra um exemplo dos experimentos realizados conforme descrito acima. Os genes foram examinados em relação a sua expressão entre 24 horas (1 dia) e 168 horas (7 dias) depois da indução de diferenciação em células cmES, indicando que o gene Wnt-3 exibiu um pico de forte expressão entre 72 e 120 horas depois da indução de diferenciação, e, então, sua expressão desapareceu (Figura 6). Portanto, nessas células ES, o período de elevada expressão de gene Wnt-3 pode ser determinada como sendo de 72 horas depois da indução de diferenciação, por meio do que se obtém quase os mesmos resultados que em células ES de camundongo.

Exemplo 6: Efeito de intensificação de tratamento com proteína Wnt recombinante sobre a aparência de cardiomiócitos derivados a partir de células ES
(2)

Células cmES foram usados para estudar o efeito de tratamento com proteína Wnt recombinante. Da mesma maneira que a usada no Exemplo 5, células cmES foram cultivadas e induzidas a se diferenciar. Nesse caso, alguns dos grupos experimentais foram cultivadas durante 72 horas (3 dias) entre 48 e 120 horas depois de indução de diferenciação em meio contendo uma proteína recombinante comercialmente disponível WNT-1 (PeproTech), Wnt-3a (R&D Systems) ou WNT-7A (R&D Systems).

Para confirmar a diferenciação e o desenvolvimento de cardiomiócitos a partir das células cmES, os EBs resultantes foram observados em relação a sua capacidade de batimento espontâneo e também investigadas em relação à expressão de genes e de proteínas de várias moléculas de

marcador específico de miocárdio. No grupo não tratado, 10% ou menos dos EBs exibiram batimento parcial cerca de 2 semanas depois da indução de diferenciação. Ao contrário, nos grupos tratados com Wnt, o batimento espontâneo se iniciou cerca de 10 dias depois da indução de diferenciação, e quase metade dos EBs exibiram batimento em 16 dias depois da indução de diferenciação.

Além disso, para a análise de genes expressos, EBs foram coletados em 10 dias depois da indução de diferenciação para detectar a expressão de vários genes de marcador da mesma maneira que a usada no Exemplo 5. Os iniciadores usados para a detecção de transcritos de Nestina de sagüi comum, ANP, MLC-2a e MLC-2v (a que se refere, doravante, como cmNestina, cmANP, cmMLC-2a e cmMLC-2v, respectivamente) são conforme mostrados abaixo.

cmNestina

(Avante) 5'-GCCCTGACCACTCCAGTTTA-3' (SEQ ID NO: 32),
(Reverso) 5'-GGAGTCCTGGATTTCTTCC-3' (SEQ ID NO: 33)

cmANP

(Avante) 5'-GAACCAGAGGGGAGAGACAGA-3' (SEQ ID NO: 34),
(Reverso) 5'-CCCTCAGCTTGCTTTTTAGGAG-3' (SEQ ID NO: 35)

cmMLC-2a

(Avante) 5'-GAGGAGAATGGCCAGCAGGAA-3' (SEQ ID NO: 36),
(Reverso) 5'-GCGAACATCTGCTCCACCTCA-3' (SEQ ID NO: 37)

cmMLC-2v

(Avante) 5'-AGGAGGCCTTCACTATCATGG-3' (SEQ ID NO: 38),

(Reverso) 5'-GTGATGATGTGCACCAGGTTC-3' (SEQ ID NO: 39)

Quando comparados ao grupo não tratado, EBs no grupo tratado com Wnt-3a em 10 dias depois da indução de diferenciação mostraram expressão significativamente mais forte para genes de marcador de cardiomiócito típicos cmANP, cmMLC-2a e cmMLC-2v (Figura 7). Resultados similares também foram obtidos para EBs no grupo tratado com WNT-1.

Ao contrário, a expressão de cmNestina, conhecida como um marcador neuronal, foi reduzida de maneira significativa nos grupos tratados

com Wnt.

Subseqüentemente, o tingimento imuno-histoquímico foi realizado da mesma maneira que a usada no Exemplo 2 para confirmar que células que batem se desenvolveram em EBs a partir dos grupos tratados com Wnt eram cardiomiócitos que produzem proteínas de marcador específicas. A partir de EBs nos grupos tratados como Wnt (Wnt-3a, WNT-1) em 16 dias depois da indução de diferenciação, seções congeladas foram preparadas e reagidas com anticorpo anti-miosina sarcomérica, anticorpo anti-GATA-4 ou anticorpo anti-Nkx-2.5 como um anticorpo primário. Depois de reação de cor, essas seções foram observadas sob um microscópio óptico.

Como um resultado, no grupo não tratado, células positivas para proteínas de marcador específicas de cardiomiócitos de miosina sarcomérica e GATA-4 foram observadas em um número muito limitado de EBs, e houve poucas células positivas para Nkx-2.5. Ao contrário, nos grupos tratados com Wnt-3a ou WNT-1, constatou-se que a grande maioria de células constituindo EB são positivas para essas proteínas de marcador (Figura 8). Resultados similares foram também obtidos para EBs no grupo tratado com WNT-7A.

Esses resultados indicaram que o tratamento com Wnt teve um efeito de promoção significativo sobre a indução de diferenciação em miocárdio não somente em células ES de roedores, mas, também, em células ES de primatas.

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIAS

<110> Asubio Pharma Co., Ltd.

<120> MÉTODO PARA INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO PLURI-
POTENTES EM CARDIOMIÓCITOS

5 <130> FA0011-07070

<160> 27

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 370

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Met Gly Leu Trp Ala Leu Leu Pro Ser Trp Val Ser Thr Thr Leu Leu
1 5 10 15

15 Leu Ala Leu Thr Ala Leu Pro Ala Ala Leu Ala Ala Asn Ser Ser Gly
 20 25 30

Arg Trp Trp Gly Ile Val Asn Ile Ala Ser Ser Thr Asn Leu Leu Thr
 35 40 45

Asp Ser Lys Ser Leu Gln Leu Val Leu Glu Pro Ser Leu Gln Leu Leu
20 50 55 60

Ser Arg Lys Gln Arg Arg Leu Ile Arg Gln Asn Pro Gly Ile Leu His
65 70 75 80

Ser Val Ser Gly Gly Leu Gln Ser Ala Val Arg Glu Cys Lys Trp Gln
 85 90 95

25 Phe Arg Asn Arg Arg Trp Asn Cys Pro Thr Ala Pro Gly Pro His Leu
 100 105 110

Phe Gly Lys Ile Val Asn Arg Gly Cys Arg Glu Thr Ala Phe Ile Phe
 115 120 125

Ala Ile Thr Ser Ala Gly Val Thr His Ser Val Ala Arg Ser Cys Ser
30 130 135 140

Glu Gly Ser Ile Glu Ser Cys Thr Cys Asp Tyr Arg Arg Arg Gly Pro
145 150 155 160

Gly Gly Pro Asp Trp His Trp Gly Gly Cys Ser Asp Asn Ile Asp Phe
 165 170 175
 Gly Arg Leu Phe Gly Arg Glu Phe Val Asp Ser Gly Glu Lys Gly Arg
 180 185 190
5 Asp Leu Arg Phe Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Thr
 195 200 205
 Thr Val Phe Ser Glu Met Arg Gln Glu Cys Lys Cys His Gly Met Ser
 210 215 220
 Gly Ser Cys Thr Val Arg Thr Cys Trp Met Arg Leu Pro Thr Leu Arg
10 225 230 235 240
 Ala Val Gly Asp Val Leu Arg Asp Arg Phe Asp Gly Ala Ser Arg Val
 245 250 255
 Leu Tyr Gly Asn Arg Gly Ser Asn Arg Ala Ser Arg Ala Glu Leu Leu
 260 265 270
15 Arg Leu Glu Pro Glu Asp Pro Ala His Lys Pro Pro Ser Pro His Asp
 275 280 285
 Leu Val Tyr Phe Glu Lys Ser Pro Asn Phe Cys Thr Tyr Ser Gly Arg
 290 295 300
 Leu Gly Thr Ala Gly Thr Ala Gly Arg Ala Cys Asn Ser Ser Ser Pro
20 305 310 315 320
 Ala Leu Asp Gly Cys Glu Leu Leu Cys Cys Gly Arg Gly His Arg Thr
 325 330 335
 Arg Thr Gln Arg Val Thr Glu Arg Cys Asn Cys Thr Phe His Trp Cys
 340 345 350
25 Cys His Val Ser Cys Arg Asn Cys Thr His Thr Arg Val Leu His Glu
 355 360 365
 Cys Leu
 370
 <210> 2
30 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 2

Met Ala Pro Leu Gly Tyr Leu Leu Val Leu Cys Ser Leu Lys Gln Ala
 1 5 10 15

Leu Gly Ser Tyr Pro Ile Trp Trp Ser Leu Ala Val Gly Pro Gln Tyr
 5 20 25 30

Ser Ser Leu Ser Thr Gln Pro Ile Leu Cys Ala Ser Ile Pro Gly Leu
 35 40 45

Val Pro Lys Gln Leu Arg Phe Cys Arg Asn Tyr Val Glu Ile Met Pro
 50 55 60

10 Ser Val Ala Glu Gly Val Lys Ala Gly Ile Gln Glu Cys Gln His Gln
 65 70 75 80

Phe Arg Gly Arg Arg Trp Asn Cys Thr Thr Val Ser Asn Ser Leu Ala
 85 90 95

Ile Phe Gly Pro Val Leu Asp Lys Ala Thr Arg Glu Ser Ala Phe Val
 15 100 105 110

His Ala Ile Ala Ser Ala Gly Val Ala Phe Ala Val Thr Arg Ser Cys
 115 120 125

Ala Glu Gly Ser Ala Ala Ile Cys Gly Cys Ser Ser Arg Leu Gln Gly
 130 135 140

20 Ser Pro Gly Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Glu Asp Ile Glu
 145 150 155 160

Phe Gly Gly Met Val Ser Arg Glu Phe Ala Asp Ala Arg Glu Asn Arg
 165 170 175

Pro Asp Ala Arg Ser Ala Met Asn Arg His Asn Asn Glu Ala Gly Arg
 25 180 185 190

Gln Ala Ile Ala Ser His Met His Leu Lys Cys Lys Cys His Gly Leu
 195 200 205

Ser Gly Ser Cys Glu Val Lys Thr Cys Trp Trp Ser Gln Pro Asp Phe
 210 215 220

30 Arg Thr Ile Gly Asp Phe Leu Lys Asp Lys Tyr Asp Ser Ala Ser Glu
 225 230 235 240

Met Val Val Glu Lys His Arg Glu Ser Arg Gly Trp Val Glu Thr Leu

245 250 255
 Arg Pro Arg Tyr Thr Tyr Phe Lys Val Pro Thr Glu Arg Asp Leu Val
 260 265 270
 Tyr Tyr Glu Ala Ser Pro Asn Phe Cys Glu Pro Asn Pro Glu Thr Gly
 5 275 280 285
 Ser Phe Gly Thr Arg Asp Arg Thr Cys Asn Val Ser Ser His Gly Ile
 290 295 300
 Asp Gly Cys Asp Leu Leu Cys Cys Gly Arg Gly His Asn Ala Arg Thr
 305 310 315 320
 10 Glu Arg Arg Arg Glu Lys Cys His Cys Val Phe His Trp Cys Cys Tyr
 325 330 335
 Val Ser Cys Gln Glu Cys Thr Arg Val Tyr Asp Val His Thr Cys Lys
 340 345 350
 <210> 3
 15 <211> 379
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 3
 Met Lys Lys Pro Ile Gly Ile Leu Ser Pro Gly Val Ala Leu Gly Thr
 20 1 5 10 15
 Ala Gly Gly Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Met Ala Leu Ala Thr
 20 25 30
 Phe Phe Ser Phe Ala Gln Val Val Ile Glu Ala Asn Ser Trp Trp Ser
 35 40 45
 25 Leu Gly Met Asn Asn Pro Val Gln Met Ser Glu Val Tyr Ile Ile Gly
 50 55 60
 Ala Gln Pro Leu Cys Ser Gln Leu Ala Gly Leu Ser Gln Gly Gln Lys
 65 70 75 80
 Lys Leu Cys His Leu Tyr Gln Asp His Met Gln Tyr Ile Gly Glu Gly
 30 85 90 95
 Ala Lys Thr Gly Ile Lys Glu Cys Gln Tyr Gln Phe Arg His Arg Arg
 100 105 110

Trp Asn Cys Ser Thr Val Asp Asn Thr Ser Val Phe Gly Arg Val Met
 115 120 125
 Gln Ile Gly Ser Arg Glu Thr Ala Phe Thr Tyr Ala Val Ser Ala Ala
 130 135 140
 5 Gly Val Val Asn Ala Met Ser Arg Ala Cys Arg Glu Gly Glu Leu Ser
 145 150 155 160
 Thr Cys Gly Cys Ser Arg Ala Arg Pro Lys Asp Leu Pro Arg Asp Trp
 165 170 175
 Leu Trp Gly Gly Cys Gly Asp Asn Ile Asp Tyr Gly His Pro Phe Ala
 10 180 185 190
 Lys Glu Phe Val Asp Ala Arg Glu Arg Glu Arg Ile His Ala Lys Gly
 195 200 205
 Ser Tyr Glu Ser Ala Arg Ile Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala
 210 215 220
 15 Gly Arg Arg Thr Val Tyr Asn Leu Ala Asp Val Ala Cys Lys Cys His
 225 230 235 240
 Gly Val Ser Gly Ser Cys Ser Leu Lys Thr Cys Trp Leu Gln Leu Ala
 245 250 255
 Asp Phe Arg Lys Val Gly Asp Ala Leu Lys Glu Lys Tyr Asp Ser Ala
 20 260 265 270
 Ala Ala Met Arg Leu Asn Ser Arg Gly Lys Leu Val Gln Val Asn Ser
 275 280 285
 Arg Phe Asn Ser Pro Thr Thr Gln Asp Leu Val Tyr Ile Asp Pro Ser
 290 295 300
 25 Pro Asp Tyr Cys Val Arg Asn Glu Ser Thr Gly Ser Leu Gly Thr Gln
 305 310 315 320
 Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
 325 330 335
 Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asp Gln Phe Lys Thr Val Gln Thr Glu
 30 340 345 350
 Arg Cys His Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys Cys Lys Lys
 355 360 365

Cys Thr Glu Ile Val Asp Gln Phe Val Cys Lys
 370 375
 <210> 4
 <211> 354
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 4
 Met Gly His Leu Leu Met Leu Trp Val Ala Ala Gly Met Cys Tyr Pro
 1 5 10 15
 10 Ala Leu Gly Ala Ser Ala Trp Ser Val Asn Asn Phe Leu Ile Thr Gly
 20 25 30
 Pro Lys Ala Tyr Leu Thr Tyr Thr Ala Ser Val Ala Leu Gly Ala Gln
 35 40 45
 Ile Gly Ile Glu Glu Cys Lys Phe Gln Phe Ala Trp Glu Arg Trp Asn
 15 50 55 60
 Cys Pro Glu His Ala Phe Gln Phe Ser Thr His Asn Arg Leu Arg Ala
 65 70 75 80
 Ala Thr Arg Glu Thr Ser Phe Ile His Ala Ile Arg Ser Ala Ala Ile
 85 90 95
 20 Met Tyr Ala Val Thr Lys Asn Cys Ser Met Gly Asp Leu Glu Asn Cys
 100 105 110
 Gly Cys Asp Glu Ser Gln Asn Gly Lys Thr Gly Gly His Gly Trp Ile
 115 120 125
 Trp Gly Gly Cys Ser Asp Asn Val Glu Phe Gly Glu Lys Ile Ser Arg
 25 130 135 140
 Leu Phe Val Asp Ser Leu Glu Lys Gly Lys Asp Ala Arg Ala Leu Val
 145 150 155 160
 Asn Leu His Asn Asn Arg Ala Gly Arg Leu Ala Val Arg Ala Ser Thr
 165 170 175
 30 Lys Arg Thr Cys Lys Cys His Gly Ile Ser Gly Ser Cys Ser Ile Gln
 180 185 190
 Thr Cys Trp Leu Gln Leu Ala Asp Phe Arg Gln Met Gly Asn Tyr Leu

195 200 205
 Lys Ala Lys Tyr Asp Arg Ala Leu Lys Ile Glu Met Asp Lys Arg Gln
 210 215 220
 Leu Arg Ala Gly Asn Arg Ala Glu Gly Arg Trp Ala Leu Thr Glu Ala
 5 225 230 235 240
 Phe Leu Pro Ser Thr Glu Ala Glu Leu Ile Phe Leu Glu Gly Ser Pro
 245 250 255
 Asp Tyr Cys Asn Arg Asn Ala Ser Leu Ser Ile Gln Gly Thr Glu Gly
 260 265 270
 10 Arg Glu Cys Leu Gln Asn Ala Arg Ser Ala Ser Arg Arg Glu Gln Arg
 275 280 285
 Ser Cys Gly Arg Leu Cys Thr Glu Cys Gly Leu Gln Val Glu Glu Arg
 290 295 300
 Arg Ala Glu Ala Val Ser Ser Cys Asp Cys Asn Phe Gln Trp Cys Cys
 15 305 310 315 320
 Thr Val Lys Cys Gly Gln Cys Arg Arg Val Val Ser Arg Tyr Tyr Cys
 325 330 335
 Thr Arg Pro Val Gly Ser Ala Arg Pro Arg Gly Arg Gly Lys Asp Ser
 340 345 350
 20 Ala Trp

 <210> 5
 <211> 352
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Met Ala Pro Leu Gly Tyr Phe Leu Leu Leu Cys Ser Leu Lys Gln Ala
 1 5 10 15
 Leu Gly Ser Tyr Pro Ile Trp Trp Ser Leu Ala Val Gly Pro Gln Tyr
 30 20 25 30
 Ser Ser Leu Gly Ser Gln Pro Ile Leu Cys Ala Ser Ile Pro Gly Leu
 35 40 45

Val Pro Lys Gln Leu Arg Phe Cys Arg Asn Tyr Val Glu Ile Met Pro
 50 55 60
 Ser Val Ala Glu Gly Ile Lys Ile Gly Ile Gln Glu Cys Gln His Gln
 65 70 75 80
 5 Phe Arg Gly Arg Arg Trp Asn Cys Thr Thr Val His Asp Ser Leu Ala
 85 90 95
 Ile Phe Gly Pro Val Leu Asp Lys Ala Thr Arg Glu Ser Ala Phe Val
 100 105 110
 His Ala Ile Ala Ser Ala Gly Val Ala Phe Ala Val Thr Arg Ser Cys
 10 115 120 125
 Ala Glu Gly Thr Ala Ala Ile Cys Gly Cys Ser Ser Arg His Gln Gly
 130 135 140
 Ser Pro Gly Lys Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Glu Asp Ile Glu
 145 150 155 160
 15 Phe Gly Gly Met Val Ser Arg Glu Phe Ala Asp Ala Arg Glu Asn Arg
 165 170 175
 Pro Asp Ala Arg Ser Ala Met Asn Arg His Asn Asn Glu Ala Gly Arg
 180 185 190
 Gln Ala Ile Ala Ser His Met His Leu Lys Cys Lys Cys His Gly Leu
 20 195 200 205
 Ser Gly Ser Cys Glu Val Lys Thr Cys Trp Trp Ser Gln Pro Asp Phe
 210 215 220
 Arg Ala Ile Gly Asp Phe Leu Lys Asp Lys Tyr Asp Ser Ala Ser Glu
 225 230 235 240
 25 Met Val Val Glu Lys His Arg Glu Ser Arg Gly Trp Val Glu Thr Leu
 245 250 255
 Arg Pro Arg Tyr Thr Tyr Phe Lys Val Pro Thr Glu Arg Asp Leu Val
 260 265 270
 Tyr Tyr Glu Ala Ser Pro Asn Phe Cys Glu Pro Asn Pro Glu Thr Gly
 30 275 280 285
 Ser Phe Gly Thr Arg Asp Arg Thr Cys Asn Val Ser Ser His Gly Ile
 290 295 300

Asp Gly Cys Asp Leu Leu Cys Cys Gly Arg Gly His Asn Ala Arg Ala
 305 310 315 320
 Glu Arg Arg Arg Glu Lys Cys Arg Cys Val Phe His Trp Cys Cys Tyr
 325 330 335
 5 Val Ser Cys Gln Glu Cys Thr Arg Val Tyr Asp Val His Thr Cys Lys
 340 345 350
 <210> 6
 <211> 355
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 Met Gly Asn Leu Phe Met Leu Trp Ala Ala Leu Gly Ile Cys Cys Ala
 1 5 10 15
 Ala Phe Ser Ala Ser Ala Trp Ser Val Asn Asn Phe Leu Ile Thr Gly
 15 20 25 30
 Pro Lys Ala Tyr Leu Thr Tyr Thr Thr Ser Val Ala Leu Gly Ala Gln
 35 40 45
 Ser Gly Ile Glu Glu Cys Lys Phe Gln Phe Ala Trp Glu Arg Trp Asn
 50 55 60
 20 Cys Pro Glu Asn Ala Leu Gln Leu Ser Thr His Asn Arg Leu Arg Ser
 65 70 75 80
 Ala Thr Arg Glu Thr Ser Phe Ile His Ala Ile Ser Ser Ala Gly Val
 85 90 95
 Met Tyr Ile Ile Thr Lys Asn Cys Ser Met Gly Asp Phe Glu Asn Cys
 25 100 105 110
 Gly Cys Asp Gly Ser Asn Asn Gly Lys Thr Gly Gly His Gly Trp Ile
 115 120 125
 Trp Gly Gly Cys Ser Asp Asn Val Glu Phe Gly Glu Arg Ile Ser Lys
 130 135 140
 30 Leu Phe Val Asp Ser Leu Glu Lys Gly Lys Asp Ala Arg Ala Leu Met
 145 150 155 160
 Asn Leu His Asn Asn Arg Ala Gly Arg Leu Ala Val Arg Ala Thr Met

165 170 175
 Lys Arg Thr Cys Lys Cys His Gly Ile Ser Gly Ser Cys Ser Ile Gln
 180 185 190
 Thr Cys Trp Leu Gln Leu Ala Glu Phe Arg Glu Met Gly Asp Tyr Leu
 5 195 200 205
 Lys Ala Lys Tyr Asp Gln Ala Leu Lys Ile Glu Met Asp Lys Arg Gln
 210 215 220
 Leu Arg Ala Gly Asn Ser Ala Glu Gly His Trp Val Pro Ala Glu Ala
 225 230 235 240
 10 Phe Leu Pro Ser Ala Glu Ala Glu Leu Ile Phe Leu Glu Glu Ser Pro
 245 250 255
 Asp Tyr Cys Thr Cys Asn Ser Ser Leu Gly Ile Tyr Gly Thr Glu Gly
 260 265 270
 Arg Glu Cys Leu Gln Asn Ser His Asn Thr Ser Arg Trp Glu Arg Arg
 15 275 280 285
 Ser Cys Gly Arg Leu Cys Thr Glu Cys Gly Leu Gln Val Glu Glu Arg
 290 295 300
 Lys Thr Glu Val Ile Ser Ser Cys Asn Cys Lys Phe Gln Trp Cys Cys
 305 310 315 320
 20 Thr Val Lys Cys Asp Gln Cys Arg His Val Val Ser Lys Tyr Tyr Cys
 325 330 335
 Ala Arg Ser Pro Gly Ser Ala Gln Ser Leu Gly Arg Val Trp Phe Gly
 340 345 350
 Val Tyr Ile
 25 355
 <210> 7
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Iniciador Avante para Wnt-3
 <400> 7

caacagtagc aaggagcatg gactggtg 28

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Reverso para Wnt-3

<400> 8

ggctgggtcc aggtcgttta 20

10 <210> 9

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Iniciador Avante para Wnt-3a

<400> 9

gacaaaccgg gagtcagcct ttgtc 25

<210> 10

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Reverso para Wnt-3a

<400> 10

25 tgctgcaccc acagatagca 20

<210> 11

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Iniciador Avante para Wnt-8a

<400> 11

gtacatgcgc tctgctgcca tcatgtac 28

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Reverso para Wnt-8a

<400> 12

gactcgtcac agccgcagtt 20

10 <210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Iniciador Avante para GATA-4

<400> 13

acggaagccc aagaacctga 20

<210> 14

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Reverso para GATA-4

<400> 14

25 cattgctgga gttaccgctg 20

<210> 15

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Sonda para GATA-4

<400> 15

taaatctaag acgccagcag gtcttgctg 29
 <210> 16
 <211> 19
 <212> ADN
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador Avante para Nkx-2.5
 <400> 16
 tgaccagcc aaagaccct 19
 10 <210> 17
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Iniciador Reverso para Nkx-2.5
 <400> 17
 ccatcctct cggctttgt 19
 <210> 18
 <211> 24
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda para Nkx-2.5
 <400> 18
 25 cggataaaaa agagctgtgc gcgc 24
 <210> 19
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Iniciador Avante para MLC-2a
 <400> 19

ccaggcagac aagttctctc ct 22

<210> 20

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Reverso para MLC-2a

<400> 20

cttgtagtca atggtgccgg c 21

10 <210> 21

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Sonda para MLC-2a

<400> 21

caactgtttg cgctgacacc catgga 26

<210> 22

<211> 22

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Avante para MLC-2v

<400> 22

25 gcagagaggt tctcceaaga gg 22

<210> 23

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Iniciador Reverso para MLC-2v

<400> 23

aagattgccg gtaacgtcag g 21

<210> 24

<211> 26

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Sonda para MLC-2v

<400> 24

atcgaccaga tgttcgcagc ctttcc 26

10 <210> 25

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Iniciador Avante para GAPDH

<400> 25

tgcaccacca actgcttag 19

<210> 26

<211> 19

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Reverso para GAPDH

<400> 26

25 ggatgcaggg atgatgttc 19

<210> 27

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Sonda para GAPDH

<400> 27

cagaagactg tggatggccc etc 23
 <210> 28
 <211> 23
 <212> ADN
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador Avante para cmWnt-3
 <400> 28
 gaggtgaaga cctgctggtg ggc 23
 10 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Iniciador Reverso para cmWnt-3
 <400> 29
 gttgggctca caaaagttgg 20
 <210> 30
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador Avante para cm beta-Actin
 <400> 30
 25 tcctgaccct gaagtacccc 20
 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Iniciador Reverso para cm beta-Actin
 <400> 31

gtggtggtga agctgtagcc 20
 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador Avante para cmNestin
 <400> 32
 gccctgacca ctccagttta 20
 10 <210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Iniciador Reverso para cmNestin
 <400> 33
 ggagtctctgg atttccttcc 20
 <210> 34
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador Avante para cmANP
 <400> 34
 25 gaaccagagg ggagagacag a 21
 <210> 35
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Iniciador Reverso para cmANP
 <400> 35

ccctcagctt gctttttagg ag 22

<210> 36

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Avante para cmMLC2a

<400> 36

gaggagaatg gccagcagga a 21

10 <210> 37

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Iniciador Reverso para cmMLC2a

<400> 37

gcgaacatct gctccacctc a 21

<210> 38

<211> 21

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Avante para cmMLC2v

<400> 38

25 aggaggcctt cactatcatg g 21

<210> 39

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Iniciador Reverso para cmMLC2v

<400> 39

gtgatgatgt gcaccaggtt c

21

REIVINDICAÇÕES

1. Método para indução de diferenciação em cardiomiócitos a partir de células tronco pluripotentes, que compreende:

5 i) o cultivo das células tronco pluripotentes em um meio de cultura não contendo qualquer substância que promova a ativação da via de sinalização Wnt canônica durante o período de tempo entre o início da indução de diferenciação e 24 horas antes do período de elevada expressão de gene Wnt canônico; e, então

10 ii) o cultivo das células tronco pluripotentes em um meio de cultura contendo uma substância, que promova a ativação da via de sinalização Wnt canônica durante um período de tempo de 24 a 96 horas, partindo de 24 a 0 horas antes do período de elevada expressão de gene Wnt canônico.

15 2. Método, de acordo com a reivindicação 1, no qual as células tronco pluripotentes são cultivadas em um meio de cultura contendo uma substância que promova a ativação da via de sinalização Wnt canônica, partindo de 24 horas antes do período de elevada expressão de gene Wnt canônico.

20 3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, no qual as células tronco pluripotentes são cultivadas em um meio de cultura contendo uma substância que promove a ativação da via de sinalização Wnt canônica durante um período de tempo de 48 a 72 horas.

25 4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, no qual a substância que promove a ativação da via de sinalização Wnt canônica é uma substância selecionada a partir do grupo consistindo em uma proteína canônica, um inibidor de GSK3 β e um agonista de Wnt.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, no qual a substância que promove a ativação da via de sinalização Wnt canônica é uma proteína Wnt canônica.

30 6. Método, de acordo com a reivindicação 5, no qual a proteína canônica é pelo menos uma proteína Wnt selecionada a partir do grupo consistindo em Wnt-1, Wnt-3a e Wnt-5a.

7. Método, de acordo com a reivindicação 5 ou 6, no qual a con

centração da proteína Wnt canônica no meio de cultura é de 0,1 ng/mL a 500 ng/mL.

5 8. Método, de acordo com a reivindicação 4, no qual a substância que promove a ativação da via de sinalização Wnt canônica é um inibidor de GSK3 β .

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, no qual o inibidor de GSK3 β é pelo menos um inibidor selecionado a partir do grupo consistindo em inibidor VII de GSK3 β , L803-mts, SB216763 e inibidor IX de GSK3 β (BIO).

10 10. Método, de acordo com a reivindicação 8 ou 9, no qual a concentração do inibidor de GSK3 β no meio de cultura é de 2 μ moles/L a 100 μ moles/L para inibidor VII de GSK3 β , 5 μ moles/L a 500 μ moles/L para L803-mts, 10 nmoles/L a 1 μ mol/L para SB216763 ou 10 nmoles/L a 1 μ mol/L para inibidor IX de GSK3 β (BIO).

15 11. Método, de acordo com a reivindicação 4, no qual a substância que promove a ativação da via de sinalização Wnt canônica é um agonista de Wnt.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, no qual o agonista de Wnt é um derivado de aminopirimidina.

20 13. Método, de acordo com a reivindicação 11 ou 13, no qual a concentração do agonista de Wnt no meio de cultura é de 1 nmol/L a 1.000 nmoles/L.

25 14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, no qual as células tronco pluripotentes são células tronco embrionárias, células germinativas embrionárias ou células tronco de linhagem germinativa.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, no qual as células tronco pluripotentes são células tronco embrionárias.

30 16. Método, de acordo com a reivindicação 14 ou 15, no qual as células tronco pluripotentes são de origem humana.

FIG. 1a

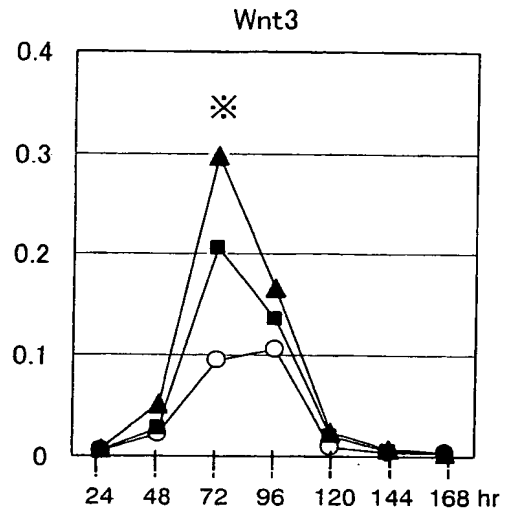


FIG. 1b

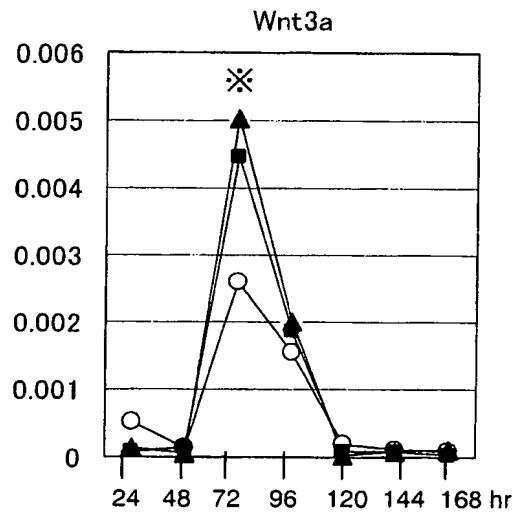


FIG. 1c

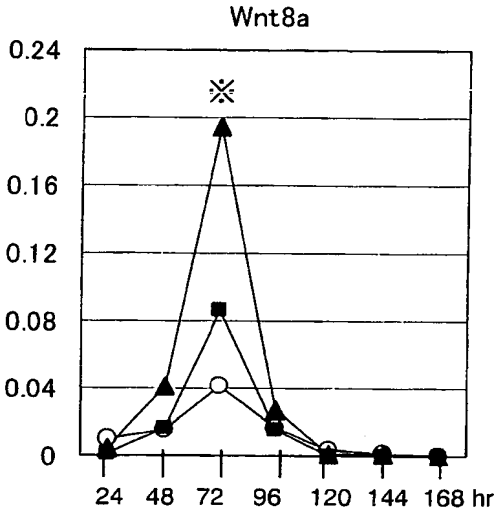


FIG. 2a

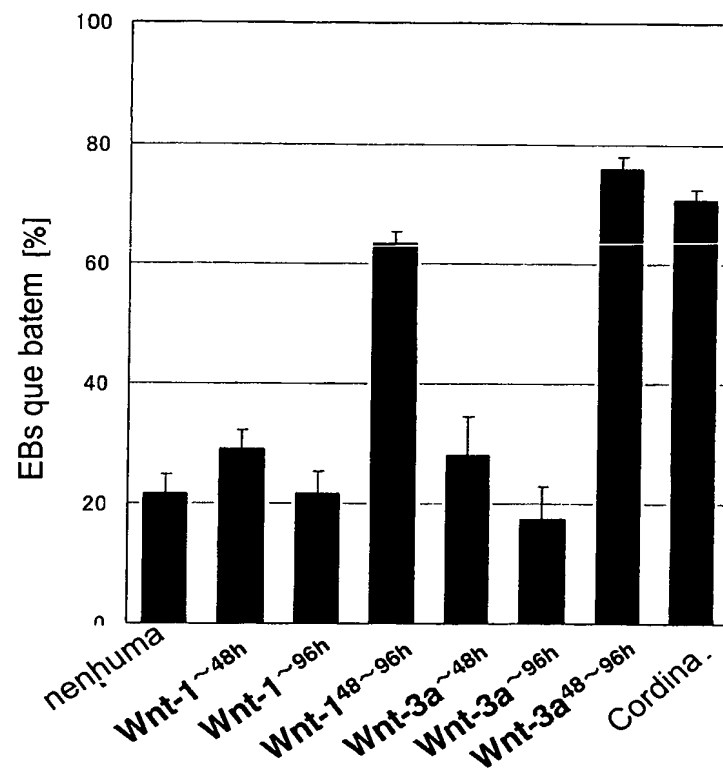


FIG. 3a

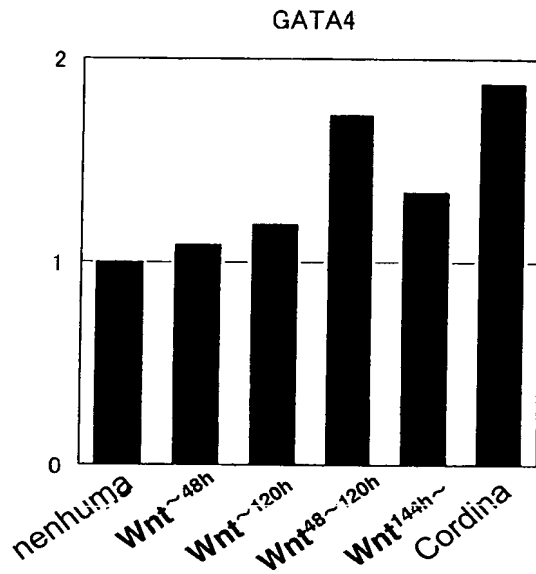


FIG. 3b

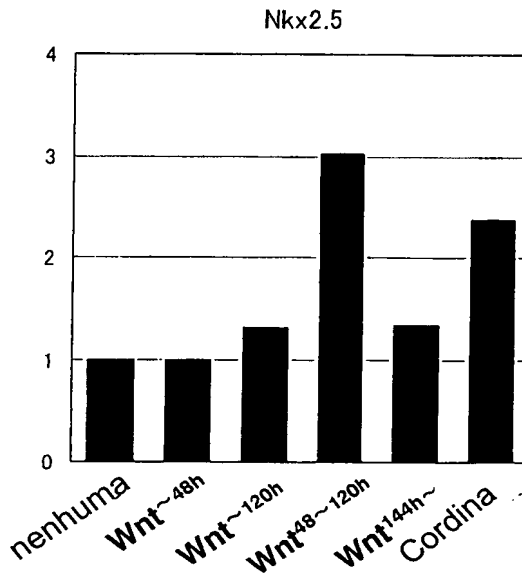


FIG. 3c

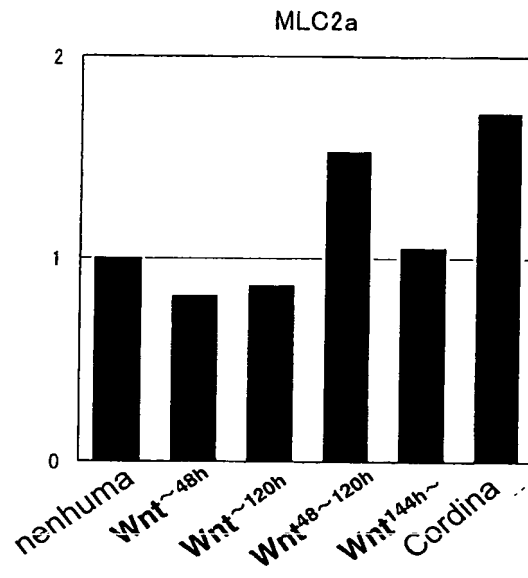


FIG. 3d

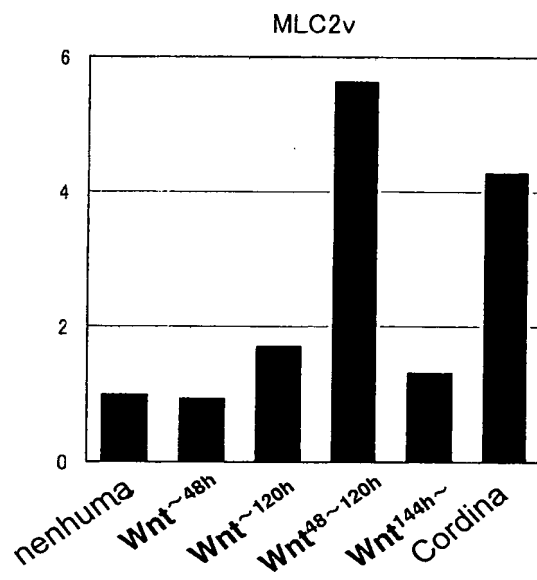


FIG. 4

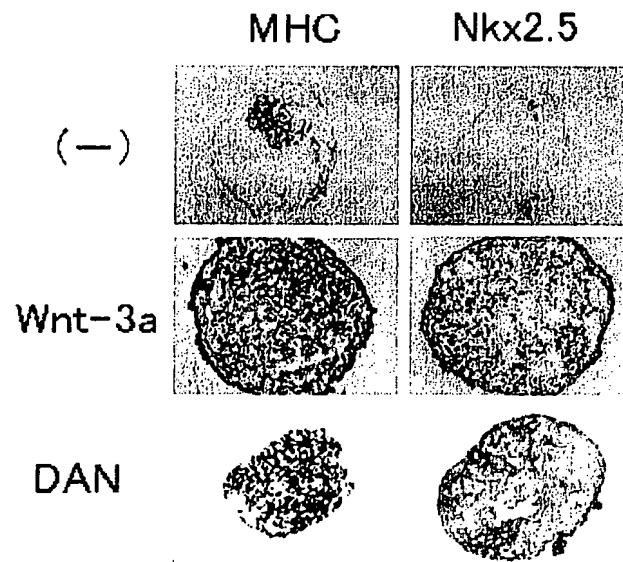


FIG. 5a

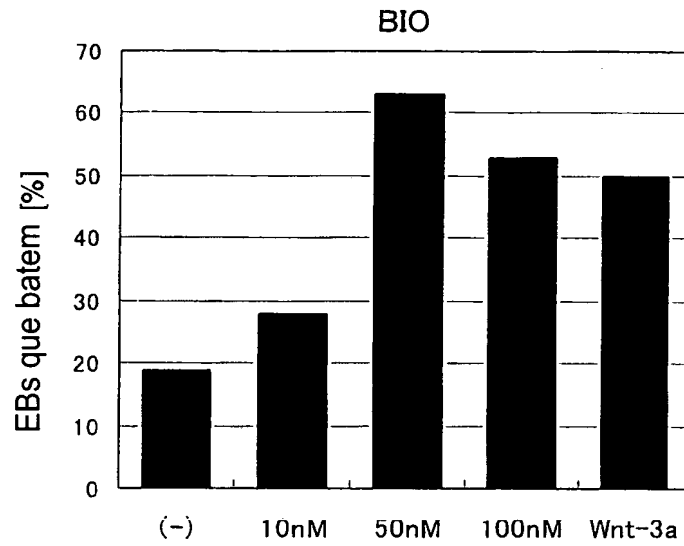


FIG. 5b

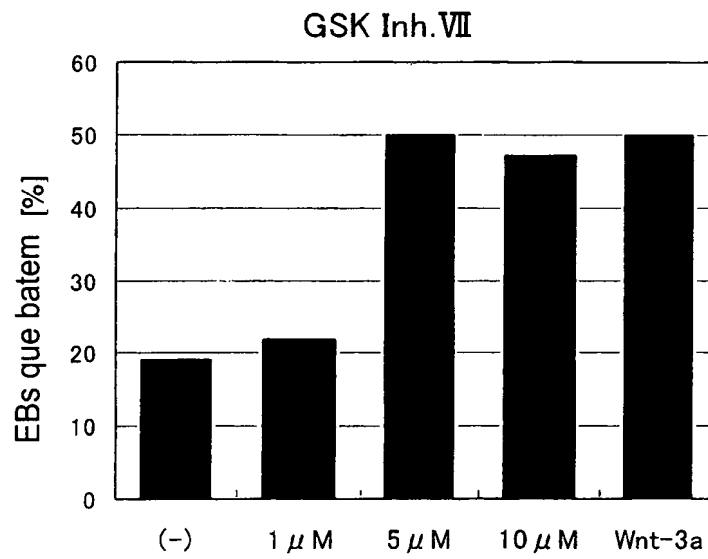


FIG. 5c

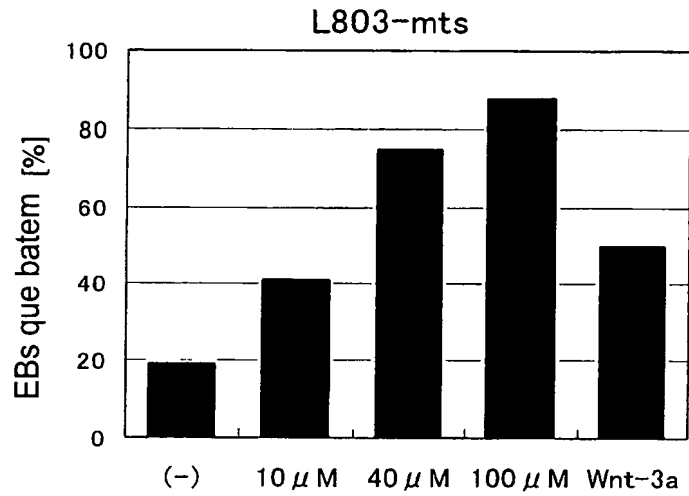


FIG. 5d

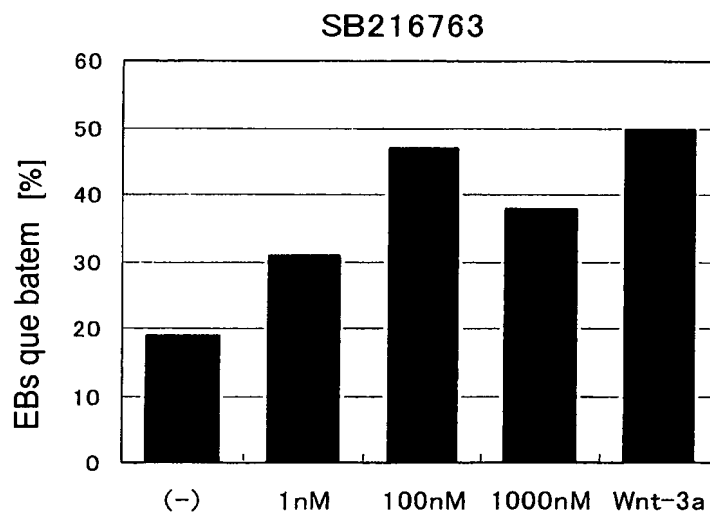


FIG. 5e

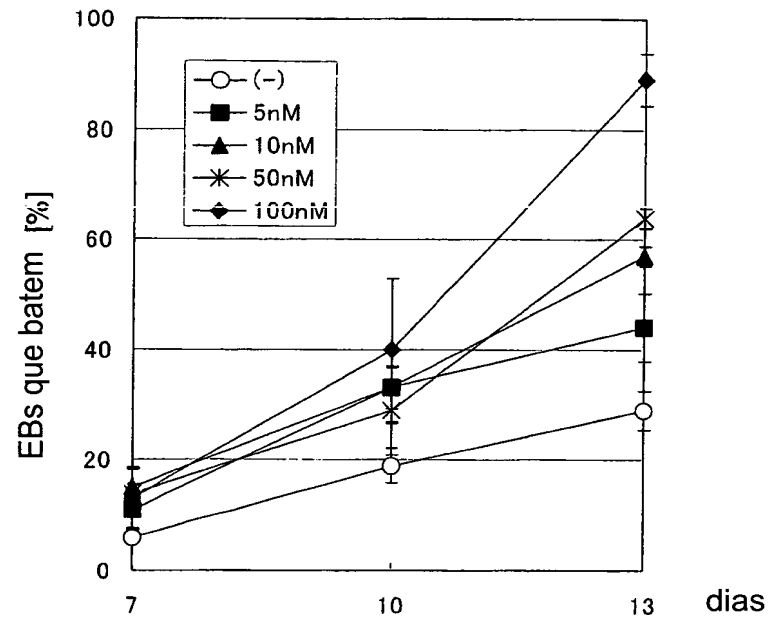


FIG. 7

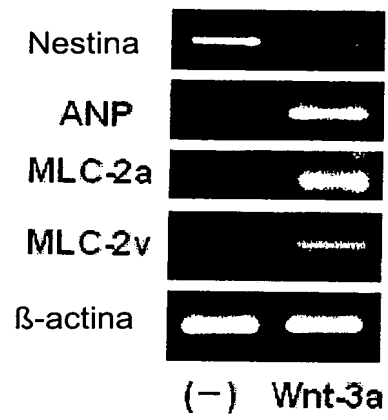
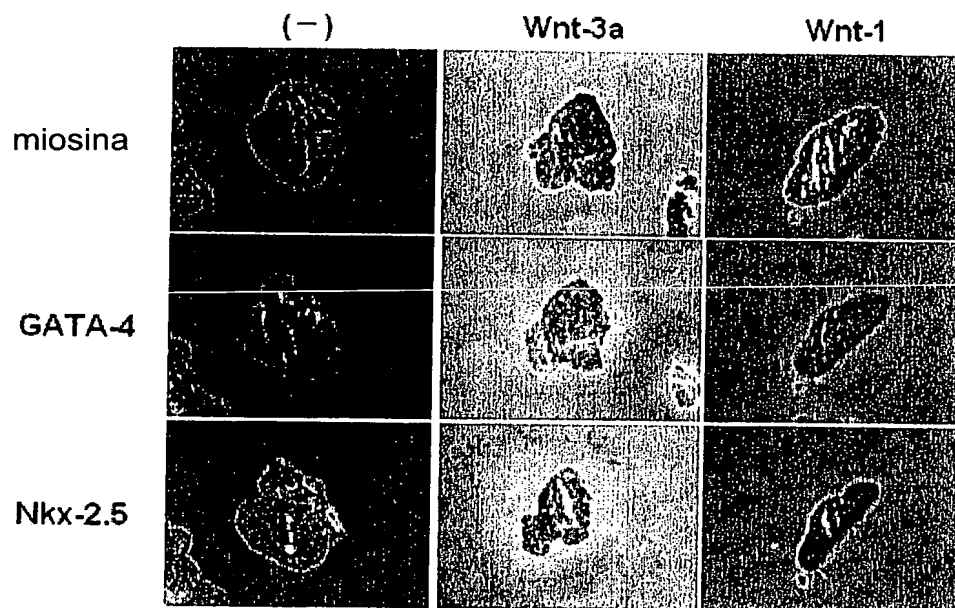


FIG. 8



RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODO PARA INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO PLURIPOTENTES EM CARDIOMIÓCITOS"

5 A presente invenção fornece um método para a indução de diferenciação em cardiomiócitos, de maneira eficiente e seletiva, a partir de células tronco.

Um método para indução de diferenciação em cardiomiócitos a partir de células tronco pluripotentes, que compreende: (i) o cultivo das células tronco pluripotentes em um meio de cultura não contendo qualquer substância que promova a ativação da via de sinalização Wnt canônica durante o período de tempo entre o início da indução de diferenciação e 24 horas antes do período de elevada expressão de gene Wnt canônico; e, então, (ii) o cultivo das células tronco pluripotentes em um meio de cultura contendo uma substância, que promova a ativação da via de sinalização Wnt canônica durante um período de tempo de 24 a 96 horas, partindo de 24 a 0 horas antes do período de elevada expressão de gene Wnt canônico.

10

15