

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

(21) **PI0706801-8 A2**

(22) Data de Depósito: 31/01/2007
(43) Data da Publicação: 05/04/2011
(RPI 2100)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 5/00
C12N 5/06

(54) Título: **MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DE CARDIOMIÓCITOS OU CARDIOMIÓCITOS PROGRAMADOS DERIVADO DE CÉLULAS TRONCO OU FETOS**

(30) Prioridade Unionista: 31/01/2006 JP 2006-023770

(73) Titular(es): Asubio Pharma Co., LTD, Keio University

(72) Inventor(es): Fumiyuki Hattori, Keiichi Fukuda

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

(86) Pedido Internacional: PCT JP2007051563 de 31/01/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/088874 de 09/08/2007

(57) Resumo: MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DE CARDIOMIÓCITOS OU CARDIOMIÓCITOS PROGRAMADOS DERIVADO DE CÉLULAS-TRONCO OU FETOS A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de um método para purificar cardiomiócitos com alto grau de purificação e com alto rendimento a partir de uma mistura celular compreendendo cardiomiócitos derivados de fetos e de células-tronco usando várias características as quais não foram anteriormente esperadas para serem usadas para a purificação de cardiomiócitos, ou as quais são recentemente descobertas, em que o referido método é executado sem sofrer qualquer modificação genética ou sem adicionar quaisquer proteínas ou agentes biologicamente ativos especiais. Os inventores da presente invenção descobriram que os cardio-miócitos foram altamente selecionados e purificados de forma eficaz pelo cultivo de cardiomiócitos derivados de células-tronco embrionárias no meio de cultura sob uma condição selecionada de uma condição selecionada com pouco soro, uma condição suplementada com pouca glicose, uma condição nutricional baixa, uma condição com pouco cálcio, uma condição com pH brandamente ácido, uma condição suplementada com ácido láctico, uma condição suplementada com ácido aspártico/ácido glutâmico e/ou uma condição suplementada com ácido pirúvico. Os inventores da presente invenção ainda descobriram que o método inventado acima, em relação às células-tronco embrionárias, foi aplicável para selecionar e purificar cardiomiócitos derivados de fetos ou de células-tronco adultas.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DE CARDIOMIÓCITOS OU CARDIOMIÓCITOS PROGRAMADOS DERIVADO DE CÉLULAS-TRONCO OU FETOS".

CAMPO TÉCNICO

5 A presente invenção refere-se a um método para purificar cardiomiócitos de uma população de células derivada de células-tronco e fetos e também a um método para os seus usos.

TÉCNICA ANTERIOR

10 Uma vez que o cardiomiócito perde a capacidade proliferativa num corpo adulto, é necessário efetuar um transplante cardíaco no tratamento de uma doença cardíaca séria, tal como enfarte cardíaco ou cardiomiopatia. Entretanto, atualmente, uma vez que há doadores de corações insuficientes, há atualmente uma necessidade urgente de desenvolver um método de tratamento diferente de transplanta cardíaco.

15 Por outro lado, o recrutamento dos cardiomiócitos produzidos *ex vivo* é esperado para ser o método mais promissor de proporcionar alívio para pacientes necessitados de transplante cardíaco. Vários métodos de preparo de cardiomiócitos foram investigados, tal como um método de diferenciação de células-tronco (células-tronco embrionárias ou várias células-tronco adultas) em cardiomiócitos ou um método para isolar cardiomiócitos
20 de fetos.

A diferenciação dos cardiomiócitos das células-tronco embrionárias é positivamente induzida através da formação de uma massa celular (um corpo embrionário) pela eliminação de fatores de supressão de diferenciação do meio de cultura (tais como células alimentadoras, fator inibitório de
25 leucemia: LIF) no caso de células-tronco embrionárias de camundongo ou fatores de supressão de diferenciação (tais como células alimentadoras, fator de crescimento de fibroblasto básico: bFGF, fator de crescimento transformante: TGF) no caso de células-tronco embrionárias humanas.

30 Um modo de diferenciação *in vitro* segue parcialmente um modo de desenvolvimento fisiológico. Especialmente, em relação aos eventos de desenvolvimento iniciais, existe uma variedade de semelhanças entre o mo-

do de desenvolvimento fisiológico em óvulos fertilizados e o modo de diferenciação *in vitro*. No curso de diferenciação do cardiomiócito *in vitro*, como também no desenvolvimento fisiológico, células de mesoblasto não-diferenciadas são primeiramente geradas, uma parte das quais é alterada em cardiomiócitos programados (células de mesoblasto pré-cardíacas) e, a seguir, diferenciadas nos cardiomiócitos. Entretanto, uma vez que as células-tronco embrionárias podem se diferenciar em quaisquer tipos de células as quais constroem um órgão num corpo é tecnicamente difícil diferenciar as células-tronco embrionárias em somente um tipo individual de células.

Além disso, uma vez que também é difícil sob condições não-fisiológicas (*in vitro*) induzir a diferenciação das células-tronco embrionárias em todos os tipos de células, então parcialmente restam células não-diferenciadas. Além disso, as células-tronco mesenquimais presentes na medula óssea ou no cordão umbilical e células-tronco teciduais presentes em vários tipos de tecidos (tais como célula-tronco neural, células-tronco derivadas adiposas e células-tronco do músculo esquelético) são consideradas como sendo as células-tronco adultas, as quais são consideradas como tendo uma capacidade de se diferenciar nos cardiomiócitos. Acredita-se que essas células se diferenciem não somente nos cardiomiócitos, mas também em vários tipos de células. Embora os detalhes dos mecanismos de diferenciação de quaisquer células-tronco adultas nos cardiomiócitos não estão completamente elucidados, sabe-se que essas células formam os cardiomiócitos, outras células diferenciadas e uma população celular contendo células não-diferenciadas depois de sofrer certo período de fase de transição.

Em resumo, todas as células-tronco causam algumas características deletérias para aplicações clínicas de modo que existem células diferentes dos cardiomiócitos as quais são geradas das células-tronco como subprodutos ou células não-diferenciadas. Uma vez que as células não-diferenciadas têm uma atividade proliferativa e têm uma capacidade de se diferenciar em muitos tipos de células, uma população celular contendo os cardiomiócitos gerados por indução de diferenciação não pode ser transplantada num corpo vivo na terapia.

Conseqüentemente, para executar seguramente o tratamento usando células-tronco e alcançar um efeito de tratamento ideal, é necessário desenvolver um método de purificação dos cardiomiócitos da população celular.

5 Até o momento, os cardiomiócitos foram purificados por um método de purificação dos cardiomiócitos pela expressão de modo específico de um marcador fluorescente tal como GFP nos cardiomiócitos e a seleção de uma célula expressando um marcador fluorescente usando um separador celular (documento de não-patente 1) ou um método de purificação dos cardiomiócitos pela expressão específica de uma proteína resistente a antibiótico nos cardiomiócitos e a seleção de células usando o antibiótico (documento de não-patente 2). Entretanto, uma vez que esses métodos têm que envolver numa alteração genética, a qual causa uma discussão relacionada com a segurança, esses métodos podem não ser usados para preparar os cardiomiócitos para o transplante no campo clínico. Além disso, uma vez que esses métodos envolvem uma alteração genética, uma questão ética e alguns riscos sérios imprevisíveis, tais como alteração na taxa de transformação, estão associados com uma alteração genômica (documento de não-patente 3).

20 Sabe-se na técnica que o coração pode usar ácido láctico gerado por um tecido diferente do coração (tal como músculo esquelético) como fonte de energia (documento de não-patente 4). Entretanto, não existe nenhuma técnica anterior para tentar purificar cardiomiócitos usando essa característica.

25 Também no coração, no fígado e no rim, ácido aspártico e ácido glutâmico são usados para transportar NADH para a mitocôndria, o mecanismo do qual é diferente daquele do outro tecido (documento de não-patente 5). O transporte de NADH para dentro da mitocôndria é indispensável para a produção de energia na mitocôndria. Entretanto, não há nenhuma técnica anterior para tentar purificar cardiomiócitos usando essa diferença
30 nesse mecanismo.

Documento de não-patente 1: Muller M, et al., FASEB J. 2000;

14: 2540 a 2548.

Documento de não-patente 2: Klug MG, et al., J. Clon. Invest. 1996; 98: 216 a 224.

Documento de não-patente 3: Schroder AR, et al., Cell. 2002; 110: 521 a 529.

Documento de não-patente 4: Khairallah M, et al., AM J. Physiol Heart Circ Physiol 2004; 286, H1461 a 1470.

Documento de não-patente 5: Chatham JC, et al., J. Biol. Chem 1995; 270: 7999 a 8008.

10 DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

UM PROBLEMA A SER RESOLVIDO PELA INVENÇÃO

Um objetivo da presente invenção é desenvolver um método de purificação de cardiomiócitos num grau elevado de purificação e com um rendimento elevado de uma mistura celular compreendendo cardiomiócitos derivados de fetos e células-tronco usando várias características as quais não foi esperado anteriormente que fossem usadas para a purificação de cardiomiócitos ou as quais foram recentemente descobertas, em que o referido método é executado sem sofrer qualquer alteração genética ou sem adicionar quaisquer proteínas especiais ou agentes biologicamente ativos.

20 FORMAS DE RESOLVER O PROBLEMA

Os inventores da presente invenção efetuaram um estudo exaustivo para as composições de vários tipos de meios de cultura para construir um sistema para produzir eficientemente cardiomiócitos derivados de células-tronco embrionárias. Baseando-se nos resultados considerando um estudo para uma concentração de cada componente dos vários meios de cultura ou um estudo para a regulação do ritmo de alterações numa concentração de cada componente de vários meios de cultura obtidos pela alteração das composições dos componentes de vários meios de cultura, os inventores da presente invenção descobriram os seguintes eventos:

30 (1) Um evento no qual uma inibição da diferenciação/crescimento celular e uma indução da morte celular não direcionada a cardiomiócitos ocorre, quando uma mistura celular contendo os cardiomiócitos e os não-

cardiomiócitos é cultivada numa condição suplementada com pouco soro ou numa condição sem soro;

(2) Um evento no qual uma indução de morte celular direcionada a não-cardiomiócitos ocorre, quando uma mistura celular contendo os cardiomiócitos e os não-cardiomiócitos é cultivada num meio e cultura levemente ácido;

(3) Um evento no qual uma inibição da diferenciação/crescimento celular e uma indução da morte celular direcionada a não-cardiomiócitos ocorre, quando uma mistura celular contendo os cardiomiócitos e os não-cardiomiócitos é cultivada num meio de cultura com pouco cálcio;

(4) Um evento no qual não-cardiomiócitos seletivamente sofrem morte celular, quando os cardiomiócitos são cultivados num meio de cultura nutricionalmente pobre;

(5) Um evento no qual o consumo de energia é inibido pelo enfraquecimento da pulsação autônoma em cardiomiócitos, quando os cardiomiócitos são cultivados numa condição com pouco cálcio;

(6) Um evento no qual uma formação de massa celular espontânea de cardiomiócitos é intensificada sob uma condição suplementada com pouco soro ou sob uma condição livre de soro; e

(7) Um evento no qual uma viabilidade de um cardiomiócito é significativamente reduzida quando os cardiomiócitos são cultivados depois de dispensar uma massa celular dos cardiomiócitos.

Os inventores da presente invenção descobriram que os cardiomiócitos derivados das células-tronco embrionárias podem ser selecionados ou purificados eficientemente e num alto grau pelo método otimizado usando um ou mais processos correspondendo a esses eventos. Além disso, os inventores também descobriram que os métodos desenvolvidos das propriedades das células-tronco embrionárias também são aplicáveis para selecionar ou purificar cardiomiócitos derivados de fetos ou para selecionar ou purificar cardiomiócitos derivados das células-tronco adultas. Baseando-se nessas descobertas, os inventores completaram a presente invenção.

Mais especificamente, numa modalidade, a presente invenção

proporciona um método para selecionar cardiomiócitos de uma mistura celular contendo cardiomiócitos e não-cardiomiócitos derivados de células-tronco embrionárias, fetos ou células-tronco adultas, em que a referida mistura celular é cultivada no meio de cultura sob as seguintes condições: (i) uma con-
5 dição suplementada com pouca glicose; e (ii) uma ou mais condições selecionadas do grupo consistindo em uma condição com pouco cálcio, uma condição nutricionalmente pobre, um condição suplementada com ácido láctico, uma condição suplementada com ácido aspártico/ácido glutâmico e uma condição suplementada com ácido pirúvico. Nessa modalidade, a mistura
10 celular pode ser preparada pela indução da diferenciação das células-tronco embrionárias, formando corpos embrióides compreendendo cardiomiócitos programados (células de mesoblasto não-diferenciadas), o cultivo dos corpos embrióides no meio de cultura sob uma condição suplementada com pouco soro e/ou uma condição de pH levemente ácida.

15 Em outra modalidade, a presente invenção proporciona um método para selecionar cardiomiócitos derivados de células-tronco embrionárias, em que os cardiomiócitos são selecionados pelos seguintes passos de: induzir a diferenciação das células-tronco embrionárias para formar corpos embrióides compreendendo células de mesoblasto não-diferenciadas; a se-
20 guir o cultivo dos corpos embrióides no meio de cultura sob uma condição suplementada com pouco soro e/ou uma condição de pH levemente ácido para preparar uma mistura celular compreendendo cardiomiócitos programados; e a continuação da cultura da mistura celular no mesmo meio de cultura para obter os cardiomiócitos.

25 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1 apresenta um modo de apresentação dos cardiomiócitos num corpo embrióide após a adesão da cultura.

Figura 2 mostra um modo de apresentação dos cardiomiócitos nos corpos embrióides aderidos os quais foram cultivados sob uma condição
30 sem soro.

Figura 3 mostra uma seleção bem-sucedida dos cardiomiócitos programados sob uma condição sem soro.

Figura 4 mostra um efeito de condição de pouco cálcio.

Figura 5 mostra uma seleção bem sucedida dos cardiomiócitos programados na massa de células-tronco embrionárias sob uma condição sem soro/de pH levemente ácido.

5 Figura 6-1, mostra uma análise dos cardiomiócitos programados na massa de células-tronco embrionárias sob uma condição sem soro/com pH levemente ácido.

 Figura 6-2 mostra uma análise dos cardiomiócitos programados na massa de células-tronco embrionárias sob uma condição sem soro/com
10 pH levemente ácido.

 Figura 7 mostra uma massa de cardiomiócitos a qual é selecionada pelo cultivo de células-tronco embrionárias sob uma condição sem soro/com pH levemente ácido.

 Figura 8 mostra uma seleção de cardiomiócitos pelo cultivo de
15 células sob uma condição em açúcar, sem soro e suplementada com ácido láctico.

 Figura 9 mostra imagens com manchamento específico de cardiomiócitos para células as quais são selecionadas e coletadas durante o cultivo das células sob uma condição sem açúcar/sem soro e suplementada
20 com ácido láctico.

 Figura 10 mostra as massas de cardiomiócitos e as massas de células mortas as quais são exatamente selecionadas pelo cultivo das células sob uma condição em soro/levemente ácida/com pouco cálcio/sem açúcar e suplementada com ácido láctico.

25 Figura 11 mostra um resultado de um método para eliminar agregados de alta densidade consistindo nas massas das células mortas usando centrifugação por gradiente de densidade.

 Figura 12-1 mostra as massas dos cardiomiócitos selecionadas pelo cultivo das células sob uma condição sem soro/levemente ácida/com pouco cálcio/sem açúcar e suplementada com ácido láctico.
30

 Figura 12-2 mostra as massas dos cardiomiócitos selecionados pelo cultivo das células sob uma condição sem soro/levemente ácida/com

pouco cálcio/sem açúcar e suplementada com ácido láctico.

Figura 13 mostra os cardiomiócitos purificados pelo cultivo das células sob uma condição sem soro/levemente ácida/com pouco cálcio/sem açúcar e uma suplementada com ácido aspártico/ácido glutâmico.

5 Figura 14 mostra os resultados da purificação dos cardiomiócitos das células-tronco da medula óssea.

Figura 15 mostra os resultados da purificação dos cardiomiócitos dos fetos.

10 Figura 16 mostra regiões contendo células pulsantes autonomi- camente sob uma condição sem soro/levemente ácida/com pouco cálcio/sem açúcar e uma suplementada com ácido pirúvico.

Figura 17 mostra as massas de cardiomiócitos de sagüi, os quais são selecionados pelo cultivo das células por 15 dias sob uma condição sem açúcar/sem soro e uma suplementada com ácido láctico.

15 Figura 18 mostra imagens de manchamento específicas de cardiomiócitos para células de sagüi as quais são selecionadas e coletadas pelo cultivo das células sob uma condição sem açúcar/sem soro e uma suplementada com ácido láctico.

20 Figura 19 mostra que a células de sagüi, as quais são selecionadas e coletadas pelo cultivo sob uma condição sem açúcar/livre de soro e uma suplementada com ácido láctico são enxertadas com sucesso no coração de um receptor.

25 Figura 20 mostra imagens das massas celulares derivadas de células-tronco embrionárias humanas, as quais foram obtidas pelo cultivo sob uma condição contendo açúcar (controle) (isto é, condição de controle) e a aparência das massas celulares derivadas das células-tronco embrionárias humanas, as quais foram obtidas pela cultura seletiva de cardiomiócito sob uma condição sem açúcar (seleção de cardiomiócito) por 15 dias (isto é, condição de seleção de cardiomiócito).

30 Figura 21 mostra imagens de imunomarcagem das massas celulares derivadas das células-tronco embrionárias humanas usando um anticorpo antiactinina e um anticorpo anti-Nkx2.5, em que as massas celulares

foram formadas pelos cardiomiócitos os quais reiniciam a pulsação autonômica. As massas celulares foram preparadas pelo cultivo das células-tronco embrionárias humanas sob uma condição sem açúcar (seleção de cardiomiócito) por 15 dias e, a seguir, pela alteração da condição do meio de cultura.

5 MODALIDADES DE IMPLEMENTAÇÃO DA INVENÇÃO

Um tratamento apropriado para induzir a diferenciação de cardiomiócitos geralmente causa a diferenciação das células-tronco com uma capacidade de se diferenciar nos cardiomiócitos (isto é, células-tronco embrionárias e células-tronco adultas, tais como células-tronco da medula óssea) nos cardiomiócitos. É possível induzir a diferenciação das células-tronco embrionárias nos cardiomiócitos usando o método de gota suspensa, no qual, por exemplo, as células-tronco embrionárias de camundongo são incubadas na cultura de suspensão sob uma condição na ausência do fator inibitório de leucemia (LIF) para formar uma massa celular (um corpo embrionário). Também, da mesma forma, as células-tronco embrionárias de sagüi ou as células-tronco embrionárias humanas podem ser usadas para induzir a diferenciação das células-tronco embrionárias nos cardiomiócitos.

O presente método pode ser aplicado às células-tronco derivadas de qualquer espécie de mamífero. Por exemplo, os exemplos da espécie de mamífero da qual as células-tronco são derivadas, usadas no presente método incluem, porém não estão limitadas, ao camundongo, vaca, cabra, cachorro, gato, sagüi, macaco rhesus, humano e assim por diante. Os exemplos das células-tronco usadas para a presente invenção incluem células ES de mamíferos, as quais são amplamente usadas na técnica como células ES de camundongo, células ES de macaco e células ES humanas.

Os exemplos específicos das células ES de camundongo incluem células EB3, células E14, células D3, células CCE, células R1, células 129SV, células J1 e assim por diante. As células ES de camundongo usadas para a presente invenção são disponíveis da American Type Culture Collection (ATCC), Chemicon, e Cell & Molecular Technologies, e assim por diante.

Os exemplos das células ES de macaco incluem células ES estabelecidas de macaco rhesus (*Macaca mulatta*) (thomson et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 1995; 92: 7844), células ES estabelecidas de macaco cino-
mólogo (*Macaca fascicularis*) (Suemori et al., Dev. Dyn. 2001; 222: 273 a
279) e células ES estabelecidas de sagüis comuns (*Callithrix jacchus*) (Sa-
saki et al., Stem Cells. 2005; 23: 1304 a 1313), as quais são todas disponí-
veis da técnica. Por exemplo, as células ES de sagüi são disponíveis do
Central Institute for Experimental Animals (Kawasaki, Japão).

Até o momento, várias dúzias de células ES humanas foram es-
tabelecidas no mundo, e uma quantidade de linhagens celulares ES huma-
nas são registradas na lista do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Uni-
dos (United States National Institute of Health)
([HTTP://stemcells.nih.gov/registry/index.asp](http://stemcells.nih.gov/registry/index.asp)) e estão disponíveis. Nos Esta-
dos Unidos, algumas linhagens celulares ES humanas também são comer-
cialmente disponíveis de Cellartis, ES Cell International, Wisconsin Alumni
Research Foundation, e etc. Também no Japão, algumas linhagens de célu-
las ES humanas são disponíveis do Centro de Pesquisa de Células-tronco (o
Institute for Frontier medical Sciences, Universidade de Kyoto) (Suemori et
al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006; 345: 926 a 932).

Além disso, as células ES de vaca (Mitalipova et al., Cloning
2001; 3: 59 a 67), células ES de galinha (Petitt et al., Mech. Dev. 2004; 121:
1159 a 1168) e células ES de peixe paulistinha (zebrafish) (Fishman, M. C.
Science 2001; 294: 1290 a 1291) também foram estabelecidas.

De um modo geral, as células ES são estabelecidas pelo cultivo
de embriões prematuros. Em adição a este método, é possível produzir célu-
las ES do embrião prematuro as quais sofrem o transplante de núcleo do
núcleo de células somáticas (Munsie et al., Curr. Biol. 10: 989, 2000; Waka-
yama et al., Science 292: 740, 2001; Hwang et al., Science 303: 1669,
2004). Também há alguns relatórios que tentam isolar células-troncos como
se segue: um método para produzir células ES das células embrionárias par-
tenogenéticas as quais são desenvolvidas até um estágio equivalente ao
estágio de blastocisto (Publicação de Patente Americana N°. 02/168763;
Vrana et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 11911-6, 2003) e um método
para produzir células ES com informação genética originalmente contida no

núcleo de células somáticas pela fusão das células ES e das células somáticas (WO 00/49137; Tada et al., Curr. Biol. 11: 1553, 2001). Os exemplos das células ES usadas na presente invenção incluem células ES preparadas pelo método descrito acima ou células nas quais um ou mais genes no cromossomo das células ES são alterados pela técnica de engenharia genética.

Além disso, os exemplos das células-tronco usadas no método da presente invenção incluem não somente células ES, mas também quaisquer células-tronco com características similares às daquelas das células ES, as quais são derivadas de células de órgãos ou tecidos adultos mamíferos, células da medula óssea, células sanguíneas e células de embriões ou fetos. Nesse contexto, a frase "características similares às daquelas das células ES" pode ser definida por características de biologia celular específicas para as células ES (tal como a presença de um marcador de superfície (antígeno) específico para as células ES, a expressão de gene específico de células ES ou uma capacidade de formar teratoma ou camundongo quimérico). Os exemplos específicos das células-tronco com características similares às daquelas das células ES incluem células EG produzidas a partir de células germinativas primordiais, células GS produzidas de células germinativas testiculares e células-tronco pluripotentes induzidas (células iPS) produzidas a partir de células somáticas tais como fibroblastos usando uma técnica de engenharia genética especial. É considerado que, nesse método, corpos embrioides depois de 3 a 6 dias do início da indução da diferenciação, induzida pelo cultivo das células-tronco pela cultura de suspensão na ausência de LIF, incluem células de mesoblasto não-diferenciadas e cardiomiócitos programados os quais se diferenciam em cardiomiócitos no futuro. Sabe-se na técnica que, no caso de indução das células-tronco embrionárias, um cardiomiócito aparece depois de 7 dias a partir do início da indução da diferenciação (no caso das células-tronco embrionárias humanas, depois de 10 dias do início da indução da diferenciação). Entretanto, os corpos embrioides preparados dessa forma usando as células-tronco embrionárias incluem não somente os cardiomiócitos descritos acima, porém também as células as quais não têm a capacidade de se diferenciar nos cardiomiócitos (tais como

as células não-diferenciadas, as células tipo endotélio-epitélio e as células neuronais). Na presente invenção, quaisquer células diferentes dos cardiomiócitos ou células as quais se diferenciam nos cardiomiócitos no futuro (tais como células de mesoblasto não-diferenciadas, os cardiomiócitos programados) são referidos como um "não-cardiomiócito".

Os presentes inventores estudaram os efeitos das condições de cultivo tais como uma condição suplementada com pouco soro, uma condição suplementada com pouca glicose, uma condição nutricionalmente pobre, uma condição com pouco cálcio, uma condição com pH levemente ácido na seleção dos cardiomiócitos, para discriminar especificamente os cardiomiócitos ou células os quais se diferenciam nos cardiomiócitos no futuro a partir de não-cardiomiócitos contidos nos corpos embrióides preparados dessa forma.

Como resultado, os presentes inventores descobriram que quando uma mistura celular contendo a célula de mesoblasto não-diferenciada, os cardiomiócitos programados e os cardiomiócitos são cultivados sob uma ou mais condições as quais são selecionadas do grupo consistindo em uma condição suplementada com pouco soro, uma condição suplementada com pouca glicose, uma condição nutricionalmente pobre, uma condição com pouco cálcio, uma condição com pH levemente ácido, sozinhas ou em qualquer combinação, os cardiomiócitos ou células os quais se diferenciam nos cardiomiócitos no futuro são menos sensíveis ao efeito citotóxico em comparação com os não-cardiomiócitos sob tal condição.

Com base nessa descoberta, na presente invenção, células as quais são viáveis mesmo sob as condições acima foram capazes de ser selecionadas como cardiomiócitos programados e cardiomiócitos de uma mistura celular contendo a célula de mesoblasto não-diferenciada, os cardiomiócitos programados e os cardiomiócitos, pelo cultivo da mistura celular sob a condição de uma condição suplementada com pouca glicose juntamente com qualquer uma ou quaisquer combinações de uma condição suplementada com pouco soro, uma condição nutricional pobre, uma condição com pouco cálcio e uma condição de pH levemente ácida.

O método de seleção acima descrito é para selecionar as células de interesse pelo cultivo da mistura celular sob a condição à qual os cardiomiócitos são fisiologicamente resistentes e, conseqüentemente, é referida como "método de seleção baseado na resistência fisiológica". O método de seleção baseado na resistência fisiológica da presente invenção é caracteri-

5 zado pelo cultivo da mistura celular contendo os cardiomiócitos no meio de cultura sob a condição selecionada de uma condição suplementada com pouca glicose, uma condição suplementada com pouco soro, uma condição nutricional baixa, uma condição com pouco cálcio ou uma condição de pH

10 levemente ácido.

Na presente invenção, o termo "uma condição suplementada com pouca glicose" é definida como sendo uma condição sob a qual a mistura celular é cultivada no meio de cultura com nível reduzido de açúcares (isto é, grupo de substâncias incluindo polissacarídeos e monossacarídeos (tais

15 como glicose, galactose, frutose, manose), os quais se dissolvem bioquimicamente e convertidos *in vivo* ou intracelularmente para finalmente serem catabolizados pelo sistema glicolítico). Na modalidade preferida, o termo "uma condição suplementada com pouca glicose" significa que a mistura celular é cultivada no meio de cultura na ausência dos açúcares acima ou no

20 meio de cultura no qual o nível de açúcar é limitado a menos de 1% em comparação com o nível de açúcares no meio de cultura usado para a indução da diferenciação. Na presente invenção, é desejável eliminar glicose, dentre outros, o tanto quanto for possível para o meio de cultura. Por exemplo, os meios de cultura comercialmente disponíveis os quais são geralmente

25 usados na técnica (tais como a-MEM, MEM, [BBS de Hank], DMEM) contêm 1 g/L de D-glicose (5,56 mM), RPMI 1640 contém 2,0 g/L de D-glicose (11,12 mM) e F-12 de Ham contém 1,82 g/L de D-glicose (10,12 mM), respectivamente. Conseqüentemente, o meio de cultura com o nível de açúcares sendo reduzido até 1% significa o meio de cultura contendo de 55,60 a

30 111,20 de 55,60 a 111,20 μ M de açúcares.

Os presentes inventores descobriram que, quando a mistura celular é cultivada no meio de cultura sob o nível limitado de açúcares menor

do que 1% em comparação com o nível de açúcares geralmente usado na técnica, os não-cardiomiócitos sofrem morte celular, enquanto a célula do mesoblasto não-diferenciada, os cardiomiócitos programados e os cardiomiócitos podem sobreviver no meio de cultura sob tal condição. Na presente invenção, uma condição suplementada com pouca glicose pode ser alcançada pelo uso, por exemplo, de meio de cultura RPMI (livre de açúcar) e meio de cultura DMEM (livre de açúcar) (ambos da GIBCO).

Conforme aqui utilizado, o termo "componente do soro" inclui o próprio soro, componentes de agentes biologicamente ativos contidos no soro animal ou humano e componentes produzidos recombinantemente ou artificialmente do agente biologicamente ativo. No presente relatório descritivo, o termo "uma condição suplementada com pouco soro" refere-se à condição onde o nível de soro ou o componente do soro, ou os componentes produzidos recombinantemente ou artificialmente do agente biologicamente ativo é limitado a 0% a 10% em comparação com os níveis de soro os quais são suplementados com o meio de cultura usado para obter células de mesoblasto não-diferenciadas é considerado como sendo 100%, e inclui, por exemplo, uma "condição sem soro". Conseqüentemente, um exemplo de "uma condição suplementada com pouco soro" é o caso quando 10% de soro é suplementado com o meio de cultura para obter as células de mesoblasto não-diferenciadas, a concentração de soro no meio de cultura é limitada a menos de 1% para selecionar os cardiomiócitos programados ou os cardiomiócitos. Os presentes inventores descobriram que, quando os níveis dos componentes de soro contidos no meio de cultura são limitados a menos de 10% em comparação com os níveis dos componentes de soro no meio de cultura geralmente usados na técnica, os não-cardiomiócitos sofrem morte celular, enquanto que a célula não-diferenciada, os cardiomiócitos programados e os cardiomiócitos podem sobreviver no meio de cultura.

Na presente invenção, o termo "uma condição nutricionalmente pobre" refere-se à condição onde os níveis de cada componente nutricional contido nos meios de cultura os quais são geralmente usados na técnica (tais como meio de cultura RPMI, meio de cultura DMEM, meio de cultura

MEM, meio de cultura F12 e meio de cultura a-MEM) são limitados a menos de 10%, em comparação com os níveis dos componentes nutricionais no meio de cultura geralmente usados na técnica. Na presente invenção, é desejável limitar os níveis dos componentes nutricionais até 10%. Os presentes inventores descobriram que, quando os níveis dos componentes nutricionais no meio de cultura são limitados a 10% em comparação com os níveis dos componentes nutricionais no meio de cultura geralmente usado na técnica, os não-cardiomiócitos sofrem morte celular, enquanto que a célula de mesoblasto não-diferenciada, os cardiomiócitos programados e os cardiomiócitos podem sobreviver no meio de cultura. Tal "condição nutricional pobre" do meio de cultura pode ser preparada pela diluição de 1 volume do meio de cultura geralmente usado na técnica (meio de cultura RPMI, meio de cultura DMEM, meio de cultura MEM, meio de cultura F12 e meio de cultura a-MEM) usando 9 volumes de salina fisiológica (tal como BSS de Hank (sem açúcar) ou PBS).

Na presente invenção, o termo "uma condição com pouco cálcio" refere-se à condição onde a concentração de cálcio contida no meio de cultura varia entre 0,3 e 1,3 mM. O meio de cultura geralmente usado para a diferenciação nos cardiomiócitos (tal como meio de cultura DMEM, meio de cultura MEM e meio de cultura a-MEM) contém concentração de 1,8 mM de cálcio no meio de cultura. É conhecido na técnica que a concentração de cálcio é mantido em torno de 1,8 mM, por todo o período de cultivo para a diferenciação nos cardiomiócitos. Os presentes inventores descobriram que quando a concentração de cálcio no meio de cultura está limitada entre 0,3 a 1,3 mM da concentração de cálcio, os valores dos quais são significativamente mais baixos do que a concentração de cálcio no meio de cultura geralmente usadas na técnica, os não-cardiomiócitos sofrem morte celular, enquanto que a célula de mesoblasto não-diferenciada, os cardiomiócitos programados e os cardiomiócitos podem sobreviver no meio de cultura. O meio de cultura RPMI e o meio de cultura F12 (ambos da GIBCO) podem ser usados como os exemplos do meio de cultura com uma "condição com pouco cálcio" da presente invenção.

Na presente invenção, o termo "uma condição de pH levemente ácido" refere-se à condição onde o pH do meio de cultura varia entre 6 e 7. Sabe-se da técnica que a condição de pH do meio de cultura geralmente usada para a indução da diferenciação dos cardiomiócitos (tal como meio de cultura RPMI) meio de cultura DMEM, meio de cultura MEM, meio de cultura F12 e meio de cultura α -MEM) é requerida para ser mantida por volta de pH 7,5, a qual é a mesma que a condição fisiológica. O pH do BSS básico é ajustado para ser em torno de pH 6,5 no incubador com CO₂ 5%. Os presentes inventores descobriram que, quando o pH do meio de cultura é abaixado para pH 6,5, o qual é mais ácido do que o pH do meio de cultura geralmente usado na técnica, os não-cardiomiócitos sofrem morte celular, enquanto que a célula de mesoblasto não-diferenciada, os cardiomiócitos programados e os cardiomiócitos podem sobreviver no meio de cultura. O meio de cultura com "uma condição de pH levemente ácida" da presente invenção pode ser preparado pelo ajuste do pH do meio de cultura usando a Solução de Sais Balanceada de Hank (BBS de Hank).

Na presente invenção, os cardiomiócitos podem ser purificados mais eficientemente pela exposição da mistura celular acima mencionada a qualquer combinação de duas ou mais condições adequadas do meio de cultura (isto é, o método de seleção baseado na resistência fisiológica).

Os presentes inventores descobriram que quando o meio de cultura é privado de açúcares, os não-cardiomiócitos sofreram morte celular nos corpos embrióides derivados das células-tronco embrionárias. Os presentes inventores ainda estudaram um substrato alternativo o qual pode preferivelmente fornecer aos cardiomiócitos uma energia diferente de açúcares, para o propósito de melhorar ainda mais a seletividade da célula de mesoblasto não-diferenciada, os cardiomiócitos programados e os cardiomiócitos contidos nos corpos embrióides.

Como resultado, os presentes inventores descobriram que é eficaz suplementar o meio de cultura com ácido láctico (lactato, 0,1 a 5 mM), uma combinação de um ácido aspártico (200 a 100 mg/L) e ácido glutâmico (20 a 100 mg/L) ou ácido pirúvico (0,5 a 5 mM), ou qualquer combinações

desses no lugar dos açúcares. Baseando-se nessas descobertas, é considerado que tais substituintes de açúcar podem especificamente fornecer aos cardiomiócitos os nutrientes necessários.

O método de seleção descrito acima é referido como "método de seleção baseado em metabolismo", uma vez que o método usa a capacidade metabólica dos cardiomiócitos para selecionar os cardiomiócitos. O método de seleção baseado em metabolismo da invenção é caracterizado pelo cultivo da mistura celular contendo os cardiomiócitos sob uma condição suplementada com ácido láctico, uma condição suplementada com ácido aspártico/ácido glutâmico ou uma condição suplementada com ácido pirúvico.

Na presente invenção, os dois tipos de métodos para selecionar os cardiomiócitos (isto é, o método de seleção baseado na resistência fisiológica e o método de seleção baseado no metabolismo) podem ser usados em combinação para purificar os cardiomiócitos num alto grau de pureza. Também os métodos acima são repetidamente executados para alcançar um grau mais alto de purificação.

A mistura celular contendo a célula de mesoblasto não-diferenciada, os cardiomiócitos programados e os cardiomiócitos os quais são usados na presente invenção como uma origem dos cardiomiócitos pode também ser preparada a partir das células-tronco ou fetos. Nesse contexto, o termo "células-tronco" inclui, porém não está limitado, a células totipotentes as quais podem se diferenciar em quaisquer tipos de células (tais como células-tronco embrionárias) e células pluripotentes as quais podem se diferenciar em múltiplos tipos particulares de células (tais como células-tronco adultas da medula óssea).

Acredita-se que, durante a preparação dos cardiomiócitos a partir das células-tronco embrionárias, conforme a diferenciação progride, as células-tronco embrionárias podem se diferenciar no mesoblasto não-diferenciado, e a seguir subsequente ser modificadas nos cardiomiócitos programados, e finalmente formar os cardiomiócitos. Aqui, "célula de mesoblasto não-diferenciada" refere-se às células as quais expressam a proteína Brachyury (um marcador específico para as células de mesoblasto

não-diferenciadas).

Entretanto, "cardiomiócitos programados" refere-se às células as
quais expressam as proteínas específicas de células de mesoblasto não-
diferenciadas, tais como a proteína Brachyury, porém não expressam as pro-
teínas específicas de cardiomiócitos, tais como a Nkx2.5 e Actinina. Os car-
diomiócitos programados têm a capacidade de se diferenciar exclusivamente
nos cardiomiócitos sem a necessidade de suplementar quaisquer substân-
cias adicionais no meio de cultura. "Cardiomiócitos" refere-se a células de
pulsação autonômica quando as células são viáveis e também a células ex-
pressando alguns marcadores, tais como Nkx2.5, GATA4 e actinina, as
quais podem ser detectadas após fixação.

Por exemplo, quando as células-tronco embrionárias de camun-
dongo são usadas como a origem dos cardiomiócitos, a população celular a
qual pode sobreviver sob essas condições de cultivo pode ser selecionada
como uma população celular consistindo nos cardiomiócitos programados ou
dos cardiomiócitos das células consistindo nos corpos embrióides pelos se-
guintes passos: indução da diferenciação das células-tronco embrionárias de
camundongo pela eliminação de LIF do meio de cultura, a seguir incubação
por 4 a 7 dias das células-tronco embrionárias de camundongo para gerar
corpos embrióides e o cultivo dos corpos embrióides sob o método de sele-
ção baseado na resistência fisiológica e/ou no método de seleção baseado
no metabolismo para selecionar a população de células viável como os car-
diomiócitos programados ou os cardiomiócitos.

A título de exemplo, depois de 5 dias do início da indução de
diferenciação, as células foram selecionadas por mais 24 horas sob uma
condição suplementada com pouca glicose e qualquer uma ou quaisquer
combinações dos quatro tipos de condições (isto é, uma condição suplemen-
tada com pouco soro, uma condição nutricional pobre, uma condição com
pouco cálcio e uma condição com pH levemente ácido). Embora as células-
tronco fossem aquelas sem capacidade de pulsação, a população celular
sem capacidade de pulsação foi imunomarcada usando um anticorpo contra
Brachyury, o marcador da célula de mesoblasto não-diferenciada, resultando

em imagens positivas de Brachyury em quase todas as células. Isso significa que o presente método é um método para selecionar efetivamente as células de mesoblasto não-diferenciadas.

Além disso, as células Brachyury positivas foram imunomarcadas usando um anticorpo contra a Nkx2.5 (a qual é um marcador de proteína homeótica de desenvolvimento prematuro atualmente conhecido específico para os cardiomiócitos), resultando em imagens negativas em quase todas as células. Todavia, o cultivo continuado das células resultou na diferenciação de cerca de 80 a 90% das células nos cardiomiócitos. Conseqüentemente, é considerado que as células de mesoblasto não-diferenciadas no método acima são desconhecidas, porém os cardiomiócitos programados mais primitivos.

A título de outro exemplo, para selecionar os cardiomiócitos, os corpos embrióides derivados das células-tronco embrionárias depois de 4 a 6 dias do início da indução de diferenciação podem ser cultivados por cerca de 3 dias no meio de cultura sem soro preparado pela mistura de MEM (meio essencial mínimo) [BSS de Hank] (Invitrogen) e um a-MEM (SIGMA) na proporção de MEM [BSS de Hank]:a-MEM = 9:1 a 1:9, suplementado com ITS [insulina (10 mg/L), transferrina (5,5 mg/L) e selenita de sódio (6,7 mg/L)] (GIBCO) (nesse caso, a concentração de cálcio foi de cerca de 1,3 mM). Essa condição de meio de cultura corresponde a uma condição suplementada com pouco soro, uma condição com pouco cálcio e uma condição de pH levemente ácido. Os cardiomiócitos programados preparados dessa forma podem ser continuamente cultivados no mesmo meio de cultura para se diferenciarem nos cardiomiócitos. Quando a manipulação da mistura celular é efetuada depois de 5 dias do início da indução da diferenciação, especialmente depois da indução dos cardiomiócitos de pulsação autonômica, é possível selecionar eficientemente o cardiomiócito pelo simples cultivo em MEM [BSS de Hank] sob uma condição suplementada com pouco soro e uma condição de pH levemente ácido. Os cardiomiócitos preparados dessa forma podem ser continuamente cultivados no meio de cultura misturado de MEM e a-MEM para se diferenciar em músculo atrial e em músculo ventricular.

A título de outro exemplo, os corpos embrióides derivados das células-tronco embrionárias foram lavados usando um meio sem açúcar tal como BSS de Hank (GIBCO) para eliminar completamente açúcares e, a seguir, foram cultivados por 3 a 7 dias no meio de cultura (BSS de Hank [sem açúcar]/DMEM [sem açúcar] = 9:1 sob uma condição suplementada com pouco soro, uma condição nutricional pobre (tal como aquelas preparadas pela diluição de 10 vezes de um meio de cultura comercialmente disponível com solução de tampão isotônico), uma condição de pH levemente ácido e uma condição com pouco cálcio, as quais foram suplementadas com 1 mM de ácido láctico (uma condição suplementada com ácido láctico), 20 mg/L de ácido aspártico e 20 mg/L de ácido glutâmico (uma condição suplementada com ácido aspártico/ácido glutâmico) ou 1 mM de ácido pirúvico (uma condição suplementada com ácido pirúvico). Como resultado, é possível selecionar eficientemente o cardiomiócito pelo método acima.

15 Numa tentativa de preparar os cardiomiócitos usando as células-tronco resultantes derivadas da medula óssea, os métodos descritos acima também são aplicáveis para selecionar os cardiomiócitos da mistura celular das células-tronco adultas. Aqui, os cardiomiócitos derivados da medula óssea de camundongo foram induzidos usando as células e o método conforme descrito em WO01/048151 (PCT/JP00/09323). Em outras palavras, células CMG são cultivadas em IMDM (meio Dulbecco modificado de Iscove) (GIBCO) suplementado com 20% de soro bovino fetal (a respeito do método para estabelecer as células CMG, ver J. Clin. Invest., 1999, Vol. 103, p 697 a 705) cultivado por mais 24 horas num meio de cultura suplementado com 25 uma concentração final de 3 μ mol/L de 5-azacitidina (SIGMA), a seguir cultivadas por 2 a 3 semanas no meio de cultura acima sem 5-azacitidina. Como resultado, esse método de seleção permite a indução da diferenciação das células em cardiomiócitos de pulsação autonômica. É possível obter os cardiomiócitos pelo cultivo adicional da mistura celular contendo os cardiomiócitos de pulsação autonômica sob o método de seleção baseado na resistência fisiológica e/ou no método de seleção baseado no metabolismo.

30 Além disso, durante a preparação dos cardiomiócitos a partir dos

fetos de camundongo, os cardiomiócitos podem ser selecionados e purificados a partir do 7º dia de vida embrionária (o ponto de tempo quando os cardiomiócitos aparecem primeiro; o ponto de tempo corresponde ao dia 16 depois da fertilização no caso de seres humanos) pelo seguinte procedimento:

- 5 isto é, remoção de modo asséptico dos fetos de camundongo, lavagem deles usando BSS de Hank [sem açúcar] quatro vezes, pipetagem de várias vezes usando uma pipeta de 10 mL para dispersar os fetos para separar as massas celulares, cultivo das massas celulares sob o método de seleção baseado na resistência fisiológica e/ou no método de seleção baseado em
- 10 metabolismo e seleção dos cardiomiócitos.

- Deste modo, na presente invenção, a mistura celular contendo a célula de mesoblasto não-diferenciada, os cardiomiócitos programados e os cardiomiócitos usados como origem dos cardiomiócitos é cultivada sob o método de seleção baseado na resistência fisiológica e/ou no método de
- 15 seleção baseado no metabolismo para ganhar massas dos cardiomiócitos, as quais são formadas pela adesão dos cardiomiócitos uns nos outros. Entretanto, uma vez que as massas preparadas dessa forma dos cardiomiócitos são cobertas por uma camada dos não-cardiomiócitos mortos, é necessário eliminar a camada de não-cardiomiócitos mortos das massas antes de
- 20 transplantar as massas dos cardiomiócitos. Considerando esse assunto os presentes inventores estudaram adicionalmente conforme descrito abaixo.

- Os presentes inventores descobriram ainda que, quando massas celulares são tratadas com um método de dispersão celular geral (tais como aqueles usando enzimas proteolíticas aleatórias tais como *Trypsin* ou agentes quelantes de íons, tais como EDTA), as células dispersas perdem significativamente a viabilidade das células. Conseqüentemente, existe necessidade por um novo método para eliminar eficientemente as células mortas aderidas na superfície dos corpos embrióides enquanto se mantêm as massas dos cardiomiócitos.

- 30 É geralmente considerado que a conjugação célula-célula é alcançada pela ligação através da matriz extracelular (tal como colágeno, fibronectina e elastina) ou pela ligação direta entre as proteínas de membra-

na. Os presentes inventores descobriram que a digestão das massas dos cardiomiócitos usando collagenase ou elastase (as quais apresentam uma elevada especificidade para as proteínas de matriz) poderiam eliminar eficientemente os não-cardiomiócitos mortos aderidos na superfície das massas celulares dos cardiomiócitos enquanto mantêm as formas das massas sem serem dispersas em células separadas. A partir dos resultados, a adesão célula-célula entre os cardiomiócitos é formada pela ligação direta através de N-caderina ou conexina.

Na presente invenção, é possível eliminar eficientemente as células mortas, por exemplo, somente pela agitação dos corpos embrióides na presença de 0,01 a 0,1% da collagenase tipo III (Wartington) por 20 minutos em banho-maria de 37°C, pela separação das células mortas dos cardiomiócitos, pela repetição da centrifugação e substituição do sobrenadante quatro vezes para remover por lavagem completamente a collagenase e pela obtenção do produto final.

Entretanto, mesmo depois do tratamento da collagenase, os agregados obtidos dessa forma podem possivelmente e indesejavelmente conter as células mortas dos não-cardiomiócitos. Quanto mais longo é efetuada a seleção baseada no metabolismo, mais frequentemente os agregados contendo células mortas podem aparecer. Examinando a densidade de tais agregados contendo células mortas, os presentes inventores descobriram que a densidade e a gravidade específica das células mortas é maior do que aquelas das células vivas e também descobriram que as células vivas podem ser separadas das células mortas usando um método de centrifugação por gradiente de densidade adequado. Um agente usado para separar células viáveis das células mortas através do método de centrifugação por gradiente de densidade inclui, porém não está limitado, a Percoll® (Pharmacia), Ficoll™ (Pharmacia), Optiprep (GIBCO).

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: formação de agregados seletivos de cardiomiócitos pelo cultivo das células-tronco embrionárias de camundongo sob uma condição suplementada com pouco soro ou uma condição sem soro

Esse Exemplo tem por objetivo estudar o efeito da depleção de soro nas massas celulares contendo os cardiomiócitos (corpos embrióides), mais especificamente o efeito da depleção de soro na seleção dos cardiomiócitos das massas celulares (os corpos embrióides), pelo cultivo das massas celulares (os corpos embrióides) no meio de cultura livre de soro.

As células-tronco embrionárias de camundongo (o nome da linhagem celular é EB3, Nat. Genet. 2000; 24: 372 a 376) foram gentilmente fornecidas pelo Dr. Hitoshi Niwa de RIKEN, Japão. As células-tronco embrionárias humanas são cultivadas por um total de 7 dias usando um método semelhante ao método existente (Differentiation 2001, 68, p31 a 43), isto é, 75 células ES por uma EB foram cultivadas como as massas celulares por um total de 7 dias no meio de cultura [α -MEM (meio mínimo essencial) (SIGMA), FBS 10% (EQUITEC BIO), penicilina 100 unidades/mL, estreptomomicina 50 μ g/mL (GIBCO)] usando o método de gota suspensa. Depois da diferenciação nas massas celulares (os corpos embrióides) contendo os cardiomiócitos usando o método acima, os corpos embrióides foram cultivados sem ficarem aderidos na placa de cultura usando o meio de cultura descrito acima por 3 a 5 dias a 37°C em 5% de CO₂. O método descrito acima é o método de diferenciação de cardiomiócito convencional. Figura 1 mostra a aparência das massas celulares obtidas sob o método convencional acima. Aqui, a Figura 1A mostra a aparência microscópica do corpo embrióide; Figura 1B mostra o esboço da região de existência dos cardiomiócitos no corpo embrióide, o qual foi detectado pela imunomarcacão fluorescente específica usando o anticorpo antiactinina (SIGMA); e Figura 1C mostra o esboço da região de existência de cardiomiócitos no corpo embrióide, a qual foi identificada pela imunomarcacão fluorescente, e foi delineada numa imagem microscópica de contraste de fase da Figura 1A. Conforme mostrado no esquema de um modo de existência dos cardiomiócitos num corpo embrióide aderido (Figura 1D), os cardiomiócitos foram rodeados por outras células e foi difícil de separá-los e purificados do corpo embrióide.

Por outro lado, as células-tronco embrionárias de camundongo foram diferenciadas nas massas celulares (os corpos embrióides) contendo

os cardiomiócitos sob a mesma condição, foram cultivadas por 5 dias ficando aderidas numa placa de cultura e foram, a seguir, cultivadas por mais 3 dias no meio de cultura sem soro para as células embrióides contendo os cardiomiócitos.

- 5 Os resultados estão apresentados na Figura 2. Aqui, a Figura 2A mostra imagens microscópicas dos corpos embrióides aderidos submetidos à cultura seletiva sob a condição acima, e Figura 2B mostra o esboço da região de cardiomiócito de pulsação autonômica nos corpos embrióides a qual foi identificada pela análise de vídeo. Conforme mostrado no esquema
- 10 de um modo de existência dos cardiomiócitos nos corpos embrióides depois da cultura seletiva (Figura 2C), a população celular dos cardiomiócitos existe na região da superfície dos corpos embrióides, onde os cardiomiócitos foram considerados como estando agregados uns aos outros.

- EXEMPLO 2: Formação dos agregados seletivos de cardiomiócitos programados e formação dos agregados contendo os cardiomiócitos numa alta taxa pela cultivo das células-tronco embrionárias de camundongo sob uma condição suplementada com pouco soro ou uma condição sem soro
- 15

- Esse exemplo visa estudar o efeito da depleção do soro nas massas celulares (os corpos embrióides) contendo os cardiomiócitos programados, mais especificamente o efeito da depleção de soro na seleção dos cardiomiócitos programados das massas celulares (os corpos embrióides), pelo cultivo das massas celulares (os corpos embrióides) contendo os cardiomiócitos programados no meio de cultura sem soro.
- 20

- As células-tronco embrionárias de camundongo foram cultivadas por 5 dias usando um método padrão descrito no Exemplo 1 no meio de cultura [a-MEM (SIGMA), FBS 10% (EQUITEC BIO), penicilina/estreptomicina (GIBCO), isto é, 75 células ES por uma EB foram cultivadas como as massas celulares no meio de cultura acima usando o método de gota suspensa por 5 dias a 37°C em 5% de CO₂ para formar os corpos embrióides. As células de pulsação autonômica foram observadas nos corpos embrióides em 7 dias após o início da cultura de diferenciação das células usando o meio de cultura existente (conforme definido no Exemplo 1). A seguir, depois de 5
- 25
- 30

dias a partir do início da cultura de diferenciação das células, o estágio quando quaisquer cardiomiócitos de pulsação autonômica não foram observados, as células foram cultivadas sob a condição sem soro por mais 1 dia (24 horas) (os mesmos resultados são produzidos em ambas as situações quando a cultura se iniciou em 4 dias ou 6 dias a partir do início da cultura de diferenciação). Figura 3A mostra a aparência morfológica dos corpos embrióides, os quais forma cultivados na condição suplementada com soro normal por 6 dias, enquanto que a Figura 3B mostra a aparência morfológica dos corpos embrióides aproximadamente no mesmo estágio que na Figura 3A, os quais foram cultivados sob uma condição livre de soro por mais 1 dia (24 horas) no 5º dia a partir do início do cultivo.

Quando as massas celulares mostradas na Figura 3B, as quais foram preparadas pelo cultivo sob uma condição sem soro por um dia adicional (24 horas) no 5º dia do início do cultivo (isto é, pelos seguintes passos: transferência do meio de cultura contendo os corpos embrióides para um tubo de centrifuga seguido pela precipitação espontânea, remoção do sobrenadante, lavagem uma vez usando meio de cultura sem soro [a-MEM (SIGMA), insulina/transferrina/selênio (GIBCO) e penicilina/estreptomicina (GIBCO)], e a seguir pela substituição com o mesmo meio de cultura) foram ainda cultivadas por mais 1 a 4 dias, as células cultivadas são diferenciadas nas massas celulares contendo cardiomiócitos de pulsação autonômica em alto índice. Conseqüentemente, os resultados demonstram que as massas celulares contendo os cardiomiócitos programados, os quais não pulsam autonomicamente porém são programados para se diferenciar nos cardiomiócitos posteriormente, com uma alta proporção podem ser formados pelo cultivo das células-tronco embrionárias de camundongo sob uma condição sem soro por mais 1 dia (24 horas) no 5º dia a partir do início do cultivo.

EXEMPLO 3: Inibição seletiva da diferenciação/crescimento das células que não são cardiomiócitos pelo cultivo de células-tronco embrionárias de camundongo sob uma condição de meio de cultura com pouco cálcio

Esse exemplo visa o estudo do efeito da concentração de cálcio reduzida nas massas celulares (os corpos embrióides) contendo os cardio-

miócitos, mais especificamente o efeito da concentração de cálcio reduzida na seleção dos cardiomiócitos das massas celulares (os corpos embrióides) pelo cultivo das massas celulares (os corpos embrióides) no meio de cultura sob a concentração de cálcio reduzida.

5 As células-tronco embrionárias de camundongo foram cultivadas por um total de 7 dias usando um método padrão descrito no Exemplo 1 no meio de cultura [a-MEM (SIGMA), FBS 10% (EQUITEC BIO), penicilina/estreptomicina (GIBCO)], isto é, 75 células ES por uma EB foram cultivadas como amassas celulares no meio de cultura usando o método de gota
10 suspensa por um total de 7 dias para formar corpos embrióides, os quais foram, a seguir, diferenciados em massas celulares (os corpos embrióides) contendo os cardiomiócitos. A concentração de cálcio no meio de cultura para a diferenciação do cardiomiócito foi de 1,8 mM. No caso desse método de cultivo, o conteúdo de cardiomiócitos foi de cerca de 10%, enquanto ou-
15 tras células foram feitas de células não-diferenciadas, das células neuronais e das células epiteliais.

 Por outro lado, nesse Exemplo, 75 células ES de camundongo por uma EB foram cultivadas como as massas celulares por 5 dias no meio de cultura [a-MEM (SIGMA), FBS 10% (EQUITEC BIO), penicilina/estreptomicina (GIBCO)] para formar os corpos embrióides usando o método de gota
20 suspensa, as quais foram a seguir aderidas na placa de cultivo, e adicionalmente cultivadas no mesmo meio de cultura por mais 1 dia (24 horas). A seguir, 6 dias depois do início da cultura de diferenciação, isto é, 1 dia (24 horas) depois de aderir os corpos embrióides na placa, no grupo de controle,
25 os corpos embrióides foram cultivados em meio de cultura RPMI (concentração de cálcio de 1,8 mM) suplementado com FBS 10% pelo dia 8 de cultivo (Figura 4A), enquanto que no grupo experimental, os corpos embrióides foram cultivados em meio de cultura RPMI (concentração de cálcio de 0,4 mM; GIBCO) suplementado com FBS 10% (Figura 4B). Como resultado, em com-
30 paração com os corpos embrióides não-tratados, no caso dos corpos embrióides tratados com uma condição com pouco cálcio, o crescimento de células de forma plana foi suprimido ao redor da periferia dos corpos embri-

óides, ou a diferenciação dos corpos embrióides nas células neuronais foi inibida (Figura 4B).

EXEMPLO 4: Seleção dos cardiomiócitos programados a partir das células-tronco embrionárias de camundongo sob uma condição sem soro/levemente

5 ácida

Esse Exemplo visa o estudo do efeito complexo da depleção de soro e uma condição de pH levemente ácida nas massas celulares (os corpos embrióides) contendo os cardiomiócitos programados, mais especificamente o efeito complexo da depleção de soro e de um pH levemente ácido na seleção dos cardiomiócitos programados das massas celulares (os corpos embrióides), pelo cultivo das massas celulares (os corpos embrióides) no meio de cultura sob uma condição sem soro e de um pH levemente ácido.

Nesse Exemplo, 75 células ES de camundongo por uma EB foram cultivadas como as massas celulares por 5 dias a partir do início da diferenciação no meio de cultura [α -MEM (SIGMA), FBS 10% (EQUITEC BIO), penicilina/estreptomicina (GIBCO)] usando o método de gota suspensa para formar corpos embrióides, os quais foram, a seguir, diferenciados nas massas celulares (os corpos embrióides) contendo os cardiomiócitos programados. Nesse Exemplo, 5 dias depois do início da cultura de diferenciação das células, o estágio onde quaisquer cardiomiócitos de pulsação autonômica ainda não foram observados, as células foram ainda cultivadas em MEM (meio essencial mínimo) (GIBCO) suplementado com insulina/transferrina/selênio (GIBCO) por mais 1 dia (24 horas) de meio de cultura (os mesmos resultados são produzidos em ambas as situações quando a cultura foi iniciada em 4 dias ou 6 dias a partir do início da cultura de diferenciação). Uma vez que a condição de pH desse meio de cultura é ajustada para estar em torno de pH 6,5 sob uma condição de 5% de CO₂, as células foram cultivadas no meio de cultura levemente ácido sob uma condição de 5% de CO₂.

A cultura resultou na formação de massas celulares contendo os cardiomiócitos programados sem a pulsação autonômica numa taxa eleva-

da. Figura 5A mostra a aparência morfológica do corpo embrióide aderido o qual foi cultivado na condição suplementada com soro normal, Figura 5B mostra a aparência morfológica do corpo embrióide, o qual foi cultivado por 1 dia (24 horas) sob uma condição sem soro, e Figura 5C mostra a aparência morfológica do corpo embrióide o qual foi cultivado por 2 dias (48 horas) sob uma condição sem soro, respectivamente. Sob a condição apresentada na Figura 5C, as células adjacentes à superfície do corpo embrióide sofreram seletivamente morte celular, enquanto que as células na parte central do corpo embrióide não sofreram morte celular (Figura 5). Figura 5D mostra o esboço da região dos cardiomiócitos programados baseando-se na análise mostrada na Figura 5C, e também mostra as células mortas indicadas pelas setas.

Os inventores obtiveram dois tipos de massas celulares nesse Exemplo: um tipo de massa celular foi selecionada pelo cultivo dos corpos embrióides depois de 5 dias a partir de sua formação por mais 24 horas sob uma condição sem soro/de pH levemente ácido; o outro tipo de massa celular foi selecionado pelo cultivo adicional das massas celulares obtidas acima por mais 3 dias (72 horas). As seções congeladas dessas massas celulares foram preparadas por imunomarcacão usando um anticorpo anti-Brachyury (Santacruz) contra a proteína Brachyury (a qual é um marcador de células de mesoblasto não-diferenciado) (Figs. 6A a 6D). Como resultado, a proporção das células Brachyury positivas cultivadas por 24 horas sob uma condição sem soro/de pH levemente ácido (Figs. 6B e 6D) foi significativamente maior em comparação com aquela das células Brachyury positivas cultivadas por 24 horas no meio de cultura contendo soro suplementado e na condição de pH natural (Figs. 6A e 6C). Quase todas as células das massas celulares selecionadas pelo cultivo por mais 3 dias são células Brachyury positivas (dados não apresentados). As massas celulares cultivadas por mais 3 dias foram imunomarcadas usando um anticorpo contra Nkx2.5 (anticorpo anti-Nkx2.5 (Santacruz)) (Figs. 6E a 6N). Acredita-se que o marcador Nkx2.5 seja um marcador de desenvolvimento inicial expresso nos cardiomiócitos programados e é conhecido por ser continuamente expresso nos car-

diomiócitos diferenciados. Figs. 6E a H mostram a aparência morfológica dos corpos embrióides (EB), os quais foram preparados pelo cultivo por 24 horas no meio de cultura contendo soro e o pH neutro, seguido pelo cultivo por mais 3 dias no mesmo meio de cultura. É mostrado que uma parte das células dentro do EB foi diferenciada nos cardiomiócitos sob essas condições de cultivo. Além disso, a proporção das células diferenciadas nos cardiomiócitos foi similar àquela das células Brachyury positivas (Figs. 6A e 6C). Por outro lado, no caso de EBs as quais foram cultivadas por 24 horas sob uma condição de pH sem soro/levemente ácida (mostrada nas Figs. 6I a N), a proporção das células diferenciadas nos cardiomiócitos foi considerada como sendo tão grande quanto 80% da quantidade total das células, a qual também foi semelhante àquela das células Brachyury positivas (Figs. 6B e 6D).

As células selecionadas pelo procedimento de 5 dias + 1 dia (24 horas) foram positivas para o anticorpo anti-Brachyury, porém foram negativas para o anticorpo anti-Nkx2.5 (Figs. 6, linhas O e P). Enquanto isso, as massas celulares selecionadas pelo procedimento de 5 dias + 1 dia (24 horas) + 3 dias foram negativas para o anticorpo anti-Brachyury, porém foram positivas para o anticorpo anti-Nkx2.5.

Deste modo, as massas celulares contendo os cardiomiócitos de pulsação autonômica numa alta taxa foram diferenciados pelo cultivo dessas massas celulares por mais 1 a 4 dias. Conseqüentemente, as células selecionadas pelo procedimento de 5 dias + 1 dia (24 horas) foram confirmadas como sendo cardiomiócitos programados.

25 EXEMPLO 5. Seleção dos cardiomiócitos a partir das células-tronco embrionárias de camundongo pelo cultivo sob uma condição sem soro/de pH levemente ácido

Esse Exemplo visa o estudo do efeito complexo de uma condição de depleção de soro e de pH levemente ácido nas massas celulares (os corpos embrióides) contendo os cardiomiócitos, mais especificamente o efeito complexo de uma depleção de soro e de uma condição de pH levemente ácido na seleção dos cardiomiócitos das massas celulares (os corpos embri-

óides) pelo cultivo das massas celulares (os corpos embrióides) no meio de cultura sem soro sob uma condição de pH levemente ácido.

Nesse Exemplo, 75 células ES de camundongo por uma EB foram cultivadas como as massas celulares por 5 dias a partir do início da diferenciação no meio de cultura [a-MEM (SIGMA), FBS 10% (EQUITEC BIO), penicilina/estreptomicina (GIBCO)] usando o método de gota suspensa para formar corpos embrióides, os quais foram, a seguir, diferenciados nas massas celulares (os corpos embrióides) contendo os cardiomiócitos programados. Nesse Exemplo, depois de 5 dias do início da cultura de diferenciação das células, o estágio quando quaisquer cardiomiócitos de pulsação autonômica não foram ainda observados, as células foram ainda cultivadas no meio de cultura MEM sem soro (GIBCO) suplementado com insulina/transferrina/selênio (GIBCO) por mais 2 dias (os mesmos resultados são produzidos em ambas as situações quando a cultura foi iniciada em 4 dias ou dias a partir do início da cultura de diferenciação). As massas celulares dos cardiomiócitos programados obtidas dessa forma foram ainda cultivadas por mais 2 dias para se diferenciar nos cardiomiócitos. Figura 7A mostra uma imagem de microscópio da massa de cardiomiócitos preparada dessa forma, e Figura 7B mostra um esquema da aparência lateral do corpo embri-
óide da Figura 7A.

Sob a condição acima, as células diferentes dos cardiomiócitos sofreram seletivamente morte celular, enquanto que os cardiomiócitos exibem uma pulsação forte e autonômica sem sofrer morte celular. Como resultado, as massas celulares contendo uma alta proporção de cardiomiócitos são geradas nesse Exemplo (Figura 7A e Figura 7B).

EXEMPLO 6: Seleção dos cardiomiócitos pelo cultivo sob uma condição sem açúcar/sem soro e suplementada com ácido láctico e preparação dos cardiomiócitos

Esse exemplo visa o estudo do efeito complexo da depleção de soro e da depleção de açúcar nas massas celulares (os corpos embrióides) contendo os cardiomiócitos, mais especificamente o efeito complexo da depleção de soro e da depleção de açúcar na seleção dos cardiomiócitos das

massas celulares (os corpos embrióides) pelo cultivo das massas celulares (os corpos embrióides) num meio sem açúcar e sem soro.

Nesse exemplo, 75 células ES de camundongo por uma EB como massa celular foram cultivadas por um total de 7 dias no meio de cultura [a-MEM (SIGMA), FBS 10% (EQUITEC BIO), penicilina/estreptomicina (GIBCO)] usando o método de gota suspensa para formar corpos embrióides, os quais foram, a seguir, diferenciados nas massas celulares (os corpos embrióides) contendo os cardiomiócitos. Os corpos embrióides cultivados por 10 dias a partir do início da diferenciação foram lavados de 4 a 5 vezes usando o meio de cultura D-MEM (meio Eagle modificado da Dulbecco) (sem açúcar) (GIBCO) para eliminar completamente açúcares no meio de cultura e, a seguir, foram cultivados por 7 dias em meio de cultura D-MEM (GIBCO) suplementado com ácido láctico numa concentração final de 1 mM (é necessário medir visualmente a viabilidade dos cardiomiócitos de pulsação autonômica e outras células nas múltiplas vezes de experimentos e para ajustar o período de cultura entre 5 a 10 dias com base na viabilidade). Uma vez que a concentração *in vivo* de ácido láctico aumenta até cerca de 4 mM sob a condição fisiológica, a concentração de ácido láctico de "1 mM" usada no método desse Exemplo cai dentro da faixa fisiológica.

Conforme mostrado na Figura 8, uma rede celular em forma arqueada consistindo no cardiomiócito viável foi formada. Em outras palavras, a Figura 8A mostra uma imagem de uma estrutura tipo rede formada pelos cardiomiócitos selecionados, e Figura 8B mostra um esquema da vista lateral do corpo embrióide da Figura 8A.

25 EXEMPLO 7: Eliminação das células mortas aderidas às massas dos cardiomiócitos

Uma vez que as massas celulares preparadas no Exemplo 6 estavam aderidas pelas células mortas ou pelas proteínas da matriz extracelular, é necessário remover as células mortas ou as proteínas da matriz extracelular das massas dos cardiomiócitos para purificar as massas. Entretanto, foi demonstrado por estudos preliminares que uma enzima que causa a proteólise não-específica (tal como *Trypsin*) diminui significativamente a via-

bilidade dos cardiomiócitos.

Desse modo, este exemplo visa o estudo de uma condição para remover seletivamente as células mortas ou a proteína da matriz extracelular das massas contendo os cardiomiócitos.

5 As massas celulares preparadas no Exemplo 6 (mostrado na Figura 8) foram tratadas com 0,01 a 0,1% de collagenase, a qual digere seletivamente o colágeno, uma das proteínas da matriz extracelular a 37°C por 20 minutos. Depois do tratamento somente com collagenase, as massas celulares foram lavadas com uma solução isotônica com uma pressão osmótica fisiológica. Nesse estágio, uma vez que os cardiomiócitos formam as
10 massas celulares (não menos do que 40 µm de diâmetro), as massas celulares foram lavadas pela troca de solução através da membrana comercialmente disponível com poros de 40 µm de diâmetro, e a seguir as células diferentes dos cardiomiócitos dispersas foram seletivamente removidas. O
15 passo de lavagem foi repetido de 4 a 5 vezes. As massas celulares coletadas foram cultivadas e, a seguir, foram imunomarcadas usando um anticorpo anti-sarcômero-actinina (SIGMA) como um indicador dos cardiomiócitos (Vermelho: [marcação da fibra estriada-cruzada no citoplasma], azul: [marcação dos núcleos com DAPI (sonda molecular)]).

20 Como resultado, foi demonstrado que a proporção dos cardiomiócitos nas massas purificadas por esse Exemplo contabilizaram 80% da quantidade total das células (Figura 9).

EXEMPLO 8: Purificação dos cardiomiócitos pelo cultivo sob uma condição sem soro/levemente ácida/com pouco cálcio/sem açúcar e suplementada com ácido láctico
25

Esse exemplo visa o estudo do efeito complexo da depleção de soro, uma condição de pH levemente ácido, uma condição com pouco cálcio e a depleção de açúcar nas massas celulares (os corpos embrióides) contendo os cardiomiócitos, mais especificamente o efeito complexo da depleção de soro, uma condição de pH levemente ácido, uma condição com pouco cálcio e depleção de açúcar na seleção dos cardiomiócitos das massas
30 celulares (os corpos embrióides) pelo cultivo das massas celulares (os cor-

pos embrióides) no meio de cultura sob uma condição sem soro, levemente ácida, sem cálcio e sem açúcar.

Nesse Exemplo, 75 células ES de camundongo por uma EB foram cultivadas como as massas celulares por 5 dias a partir do início da diferenciação no meio de cultura [a-MEM (SIGMA), FBS 10% (EQUITEC BIO), penicilina/estreptomicina (GIBCO)] usando o método de gota suspensa para formar corpos embrióides, os quais foram a seguir diferenciados em massas celulares (os corpos embrióides) contendo os cardiomiócitos programados. Nesse Exemplo, depois de 5 dias a partir do início da cultura de diferenciação das células, o estágio quando quaisquer cardiomiócitos de pulsação autonômica não foram ainda observados, as células foram ainda cultivadas no meio de cultura MEM em soro (GIBCO) suplementado com insulina/transferrina/selênio (GIBCO) por mais 2 dias (os mesmos resultados são produzidos em ambas as situações quando a cultura foi iniciada em 4 dias ou em 6 dias a partir do início da cultura de diferenciação). As massas dos cardiomiócitos programados obtidas dessa forma foram cultivadas por mais 2 dias para se diferenciarem nos cardiomiócitos. Nesse estágio, as massas celulares contendo os cardiomiócitos numa alta taxa foram geradas.

A seguir, as massas celulares foram lavadas de 4 a 5 vezes usando meio de cultura D-MEM (sem açúcar) (GIBCO) para eliminar completamente açúcares do meio de cultura, e a seguir foram cultivadas por 7 dias em meio de cultura D-MEM (GIBCO) suplementado com ácido láctico numa concentração final de 1 mM (é necessário medir visualmente a viabilidade dos cardiomiócitos de pulsação autonômica e outras células nos múltiplos tempos do experimento e ajustar o período de cultura entre 5 a 10 dias com base na viabilidade). Conforme mostrado na Figura 10, as massas dos cardiomiócitos consistindo somente do cardiomiócito viável foram formadas.

As massas celulares foram tratadas com 0,01 a 0,1% de colagenase, a qual digere seletivamente o colágeno, uma das proteínas da matriz extracelular, a 37°C por 20 minutos. Depois do tratamento com colagenase, as massas celulares foram lavadas usando o tampão com uma pressão osmótica fisiológica (NaCl 116 mM, Hepes 20 mM, NaH₂PO₄ 12,5 mM, glicose

5,6 mM, KCl 5,4 mM, MgSO₄ 0,8 mM, pH 7,35). As massas celulares foram lavadas de 4 a 5 vezes por troca de solução através da membrana comercialmente disponível com poros de 40 µm de diâmetro. Como resultado, as massas celulares consistindo somente dos cardiomiócitos e agregados de alta densidade consistindo em células mortas foram coletadas (Figura 10A). A Fig 10C mostra uma imagem aumentada da região retangular emoldurada na Figura 10A. Além disso, a localização das células mortas nas Figs. 10A e 10C estão mostradas nas Figs. 10B e 10D, respectivamente.

Foi demonstrado nesse Exemplo que os agregados de alta densidade consistindo nas células mortas mostradas na Figura 10 poderiam ser seletivamente removidos usando uma centrifugação por gradiente de densidade apropriada, mais especificamente usando a centrifugação por gradiente de densidade com 58,5% de Percoll® (Pharmacia) (Figura 11). A seguir, as massas celulares obtidas dessa forma foram cultivadas e imunomarcadas usando o anticorpo anti-sarcômero-Actinina e um anticorpo anti-GATA4 (Santacruz) como um indicador dos cardiomiócitos. Figura 12A mostra massas aderidas dos cardiomiócitos. Houve algumas células mortas suspensas em torno da periferia das massas aderidas, enquanto não foi observado nenhum não-cardiomiócito aderido. Figura 12B mostra imagens fluorescentes desenvolvidas por imunomarcção das massas celulares da Figura 12A com sarcômero-actinina (vermelho; citoplasma) e DAPI (Molecular probe) (Azul; núcleos). Figura 12C mostra imagens fluorescentes desenvolvidas por imunomarcção das massas celulares da Figura 12A com GATA4 (vermelho; núcleos) e DAPI (azul; núcleos). Os núcleos co-marcados apresentam cor púrpura. Como resultado, foi demonstrado que a proporção dos cardiomiócitos nas massas purificadas por esse Exemplo formaram 99,0% da quantidade total das células (Figura 12C).

EXEMPLO 9: Purificação dos cardiomiócitos pelo cultivo sob uma condição sem soro/levemente ácida/com pouco cálcio/sem açúcar e suplementada com ácido aspártico/ácido glutâmico

Esse Exemplo visa estudar o efeito de compensação de um ácido aspártico/ácido glutâmico nas massas celulares (os corpos embrióides)

contendo os cardiomiócitos, mais especificamente o efeito de compensação de um ácido aspártico/ácido glutâmico na seleção dos cardiomiócitos das massas celulares (os corpos embrióides) pelo cultivo das massas celulares (os corpos embrióides) no meio de cultura suplementado com ácido aspártico/ácido glutâmico sob uma condição sem soro, levemente ácida, sem cálcio e sem açúcar.

Nesse Exemplo, 75 células ES de camundongo por uma EB foram cultivadas como as massas celulares por 5 dias a partir do início da diferenciação no meio de cultura [α -MEM (SIGMA) FBS 10% (EQUITEC BIO) penicilina/estreptomicina (GIBCO)] usando o método de gota suspensa para formar corpos embrióides, as quais foram então diferenciadas nas massas celulares (os corpos embrióides) contendo os cardiomiócitos programados. Nesse Exemplo, depois de 5 dias a partir do início da cultura de diferenciação das células, o estágio quando quaisquer cardiomiócitos pulsáteis autonomicamente ainda não haviam sido observados, as células foram cultivadas no meio de cultura sob uma condição sem soro, com pH levemente ácido com pouco cálcio por 3 dias (os mesmos resultados são produzidos em ambas as situações quando a cultura se iniciou em 4 dias ou 6 dias a partir do início da cultura de diferenciação). Nesse estágio, as massas celulares geradas continham os cardiomiócitos numa taxa extremamente alta. A seguir, as massas celulares foram lavadas de 4 a 5 vezes usando meio de cultura D-MEM (sem açúcar) (GIBCO) para eliminar totalmente açúcares no meio de cultura pela troca de solução através da membrana comercialmente disponível com poros de 40 μ m de diâmetro. Finalmente, as massas celulares foram cultivadas por 5 dias em meio de cultura DMEM (sem açúcar) suplementado com 20 mg/L de ácido glutâmico (SIGMA) e 20 mg/L de ácido aspártico (SIGMA) (é necessário medir visualmente a viabilidade dos cardiomiócitos de pulsação autonômica e outras células nos vários tempos de experimentos e ajustar o período de cultura entre 3 a 10 dias com base na viabilidade). Como resultado, as massas formadas dos cardiomiócitos consistiram somente dos cardiomiócitos. As massas celulares foram tratadas, durante a agitação, a 37°C em banho-maria por 20 minutos, com 0,03% de

colagenase, a qual digeriu seletivamente o colágeno, uma das proteínas da matriz extracelular. Depois do tratamento com colagenase, as massas celulares foram lavadas com uma solução isotônica com uma pressão osmótica fisiológica (NaCl 116 mM, Hepes 20 mM, NaH₂PO₄ 12,5 mM, glicose 5,6 mM, KCl 5,4 mM, MgSO₄ 0,8 mM, pH 7,35). As massas celulares foram lavadas de 4 a 5 vezes por troca de solução através da membrana comercialmente disponível com poros de 40 µm de diâmetro. Como resultado, as massas celulares coletadas consistiam somente dos cardiomiócitos. As massas celulares obtidas dessa forma foram cultivadas e imunomarcadas usando o anticorpo anti-sarcômero-actinina e o anticorpo anti-GATA4 como indicadores dos cardiomiócitos (Figura 13).

Além disso, as células foram submetidas à análise estatística, na qual os presentes dados foram comparados com os dados conhecidos (Figura 13). Figura 13A mostra imagens microscópicas de colônias dos cardiomiócitos de pulsação autonômica, e a Figura 13B mostra imagens de mancha com sarcômero-actinina (vermelho; citoplasma), marcação com GATA-4 (verde; núcleos) e marcação com DAPI (azul; núcleos) para as colônias dos cardiomiócitos de pulsação autonômica.

Como resultado, foi demonstrado que a proporção dos cardiomiócitos nas massas purificadas por esse Exemplo compunham 99,8% da quantidade total das células. É demonstrado que esse grau de purificação foi mais alto do que os graus apresentados por quaisquer outros métodos para purificar os cardiomiócitos (por exemplo, FASEB J. 2000; 14: 2540 a 2548; J Clin Invest. 1996; 98: 216 – 224; FASEB J. 2003; 17: 740 742; J Mol Cell Cardiol. 2003; 35: 1461 – 1472). Conseqüentemente, o método desse Exemplo permite a purificação dos cardiomiócitos num alto grau de purificação e com um alto rendimento (Tabela 1).

[Tabela 1]

Tabela 1: Comparação da pureza e do rendimento entre o método da presente invenção e um método promotor-MHC/neo.

Field et al. (J. Clin. Invest. 1996; Vol. 98, 216 – 224)

Preparação	Células positivas para miosina sarcomérica	Células negativas para miosina sarcomérica	Porcentagem de cardiomiócitos
Sem seleção*	11	2000	0,55
Isolamento físico*	58	2000	3,4
Seleção de G418	791	3	99,6
	Células positivas GATA4 para actina sarcomérica	Células negativas GATA4 para actina sarcomérica	
Hattori	5041	10	99,8
	Consumo de células ES	Produção de cardiomiócitos	
Field et al.	10^6	$= 10^6$	
Hattori	7500	$= 15.000$	

Exemplo 10. Purificação dos cardiomiócitos produzidos a partir de células-tronco adultas derivadas da medula óssea de camundongo

Esse Exemplo visa à produção dos cardiomiócitos a partir de células-tronco adultas derivadas da medula óssea de camundongo, chamadas de células-tronco mesenquimais, as quais são a seguir selecionadas e purificadas.

Os cardiomiócitos diferenciados das células-tronco adultas derivadas da medula óssea de camundongo (camundongos C3H/He fêmeas) foram induzidos usando as células e o método descrito em WO01/048151. Em outras palavras, as células CMG foram cultivadas no meio de cultura de IMDM (Meio Dulbecco Modificado de Iscove) (GIBCO) suplementado com 20% de soro bovino fetal (em relação ao método para estabelecer células CMG, ver J Clin Invest, Março de 1999, Vol. 103, p 697 – 705), cultivadas por mais 24 horas num meio de cultura suplementado com uma concentração final de 3 $\mu\text{mol/L}$ de 5-azacitidina (SIGMA), a seguir cultivadas por 2 a 3 semanas no meio de cultura acima sem 5-azacitidina, resultando na indução da diferenciação dos cardiomiócitos. Depois da confirmação dos cardiomiócitos de pulsação autonômica, as células são cultivadas por 5 dias em meio de cultura D-MEM (GIBCO) suplementado com 1 mM de ácido láctico sob uma condição sem soro/com pH levemente ácido/com pouco cálcio/sem açúcar. Depois do período de cultivo, as células mortas foram removidas e as células viáveis remanescentes foram imunomarcadas usando o anticorpo anti-

sarcômero-actinina como um indicador dos cardiomiócitos.

Figura 14A mostra a aparência das células cultivadas antes da seleção. Na Figura 14A, a região contendo as células pulsáteis estão apresentadas pela linha pontilhada. As Figs. 14B – C mostram as células selecionadas. Figura 14B mostra uma imagem de microscópio de contraste de fase, e a Figura 14C mostra uma imagem fluorescente imunomarcada para sarcômero-actinina para o mesmo campo de visão da Figura 14B, respectivamente. Como resultado, foi demonstrado que a proporção dos cardiomiócitos nas massas produzidas por esse Exemplo responderam por cerca de 90% da quantidade total das células (Figura 14).

EXEMPLO 11. Purificação dos cardiomiócitos derivados de fetos de camundongo

Esse Exemplo visa à purificação dos cardiomiócitos a partir de fetos de camundongos.

Primeiro, o embrião de camundongo no 7º ao 9º dia de vida embrionária foi removido do útero materno, a partir do qual o tecido extra-embriônico foi cuidadosamente retirado, a seguir pipetado para dispersar os fetos em massas celulares separadas. As massas celulares obtidas dessa forma foram cultivadas por 5 dias no meio de cultura suplementado com 0,5 mM de ácido láctico sob uma condição sem soro/de pH levemente ácido/com pouco cálcio/sem açúcar (é necessário medir visualmente a viabilidade dos cardiomiócitos de pulsação autonômica e outras células nos vários tempos dos experimentos e ajustar o período de cultura entre 3 a 10 dias com base na viabilidade). O meio de cultura usado foi preparado pela mistura de BSS de Hank [sem açúcar]: RPMI [sem açúcar] = 9:1. Os cardiomiócitos purificados foram submetidos à cultura de adesão, e depois do cultivo, as células mortas foram removidas e as células viáveis remanescentes foram imunomarcadas para sarcômero-actinina (verde; citoplasma) como indicador dos cardiomiócitos, e DAPI (vermelho; núcleos).

Figura 15A mostra imagens microscópicas de contraste de fase de duas colônias apresentando a população celular pulsátil. Figura 15B mostra imagens fundidas de marcação com sarcômero-actinina e marcação com

DAPI para quatro colônias. Como resultado, foi demonstrado que a proporção dos cardiomiócitos nas massas produzidas por esse Exemplo correspondiam a cerca de 99% da quantidade total das células (Figura 15).

EXEMPLO 12: Purificação dos cardiomiócitos sob uma condição sem soro/levemente ácida/com pouco cálcio/sem açúcar e suplementada com ácido pirúvico

Esse Exemplo visa o estudo do efeito de compensação do ácido pirúvico nas massas celulares (os corpos embrióides) contendo os cardiomiócitos, mais especificamente o efeito de compensação de um ácido pirúvico na seleção dos cardiomiócitos das massas celulares (os corpos embrióides) pelo cultivo das massas celulares (os corpos embrióides) no meio de cultura suplementado com ácido pirúvico sob uma condição sem soro, de pH levemente ácido, sem cálcio e sem açúcar.

Nesse Exemplo, 75 células ES de camundongo por um EB foram cultivadas como as massas celulares por 5 dias a partir do início da diferenciação no meio de cultura [α -MEM (SIGMA) FBS 10% (EQUITEC BIO) penicilina/estreptomicina (GIBCO)] usando o método de gota suspensa para formar corpos embrióides, as quais foram a seguir diferenciadas nas massas celulares (os corpos embrióides) contendo os cardiomiócitos programados. Nesse Exemplo, depois de 5 dias a partir do início da cultura de diferenciação das células, o estágio quando quaisquer cardiomiócitos de pulsação autonômica não foram ainda observados, as células foram cultivadas por mais 2 dias no meio de cultura num meio de cultura MEM sem soro (GIBCO) suplementado com insulina/transferrina/selênio (GIBCO) (os mesmos resultados são produzidos em ambas as situações quando a cultura foi iniciada em 4 dias ou 6 dias a partir do início da cultura de diferenciação). As massas dos cardiomiócitos programados obtidas dessa forma foram cultivadas por mais 2 dias para se diferenciar nos cardiomiócitos. Nesse estágio, as massas celulares geradas continham s cardiomiócitos numa proporção extremamente alta. A seguir, as massas celulares foram lavadas de 4 a 5 vezes usando meio de cultura D-MEM (sem açúcar) (GIBCO) para eliminar completamente os açúcares no meio de cultura pela troca de solução através da

membrana comercialmente disponível com poros de 40 µm de diâmetro. Depois do passo de lavagem, as massas celulares foram cultivadas por 5 dias em meio de cultura D-MEM (sem açúcar) (GIBCO) suplementado com uma concentração final de 1 mM de ácido pirúvico.

- 5 As massas celulares foram, a seguir, tratadas, durante a agitação, com 0,05% de collagenase Tipo 3 (Worthington Biochemical Corp) a qual seletivamente digere o colágeno, uma das proteínas da matriz extracelular, a 37°C por 20 minutos. Depois do tratamento com collagenase, as massas celulares foram lavadas com uma solução isotônica com pressão
- 10 osmótica fisiológica (NaCl 116 mM, Hepes 20 mM, NaH₂PO₄ 12,5 mM, glicose 5,6 mM, KCl 5,4 mM, MgSO₄ 0,8 mM, pH 7,35). Como resultado, foi demonstrado que a proporção das células pulsáteis autonômicas nas massas purificadas por esse Exemplo correspondiam a mais de 90% da quantidade total das células (Figura 16).

15 EXEMPLO 13: Seleção e purificação dos cardiomiócitos derivados das células-tronco embrionárias de sagüi primata sob uma condição sem açúcar/sem soro e suplementada com ácido láctico

- Esse exemplo visa estudar o efeito complexo da depleção de soro e da depleção de açúcar nas massas celulares (os corpos embrióides)
- 20 contendo os cardiomiócitos, mais especificamente o efeito complexo da depleção de soro e da depleção de açúcar na seleção dos cardiomiócitos das massas celulares (os corpos embrióides) derivados das células-tronco embrionárias de sagüi primatas pelo cultivo das massas celulares (os corpos embrióides) no meio de cultura sem soro e sem açúcar.

- 25 As células-tronco embrionárias de sagüi são disponíveis do Central Institute For Experimental Animals (Kawasaki, Japão). As células-tronco embrionárias de sagüi foram cultivadas durante a manutenção do estado não-diferenciado usando os fibroblastos embrionários de camundongo inativados (MEF), os quais foram tratados com um tratamento com mitomicina C.
- 30 O meio de cultura [KO-DMEM (GIBCO), KO-SERUM 20% (GIBCO), L-glutamina 1,6 mM, aminoácidos não-essenciais 0,1 mM (MEM), β-mercaptoetanol 0,2 mM (2-ME; Sigma), penicilina 100 UI/mL, sulfato de es-

treptomicina 100 µg/mL e 8 mg/mL de um fator inibitório de leucemia humano recombinante (LIF; Chemicon), um fator de crescimento de fibroblasto básico humano recombinante (bFGF; Peprotech)] foi usado. Na passagem, colagenase tipo III 0,1% (Worthington) foi usada a 37°C por 10 minutos para separar as colônias de ES.

Subseqüentemente, para separar MEF e ES um do outro, a solução foi passada através de uma malha com poros de 100 µm de diâmetro, deste modo foram obtidas as massas as quais não podem passar pela malha com poros de 40 µm de diâmetro. Essas massas celulares são exatamente as massas purificadas de células ES. Na diferenciação, as massas celulares contendo 50 a 1.000 das células ES por uma EB foram cultivadas como um corpo embrióide por um total de 15 a 30 dias usando o método de placa bacteriana, a seguir para diferenciar nos corpos embrióides contendo os cardiomiócitos. O meio de cultura usado para a diferenciação foi o mesmo que o meio de cultura descrito no presente Exemplo, exceto para o bFGF [isto é, KO-DMEM (GIBCO), KO-SERUM 20% (GIBCO), L-glutamina 1,6 mM, aminoácidos não-essenciais 0,1 mM (MEM), β-mercaptoetanol 0,2 mM (2-ME; Sigma), penicilina 100 UI/mL, sulfato de estreptomicina 100 µg/mL e 8 ng/mL de um fator inibitório de leucemia humana recombinante (LIF; Chemicon)].

Para eliminar os açúcares o tanto quanto for possível do meio de cultura, os corpos embrióides foram transferidos para um tubo de centrífuga, foram lavados cinco vezes com meio de cultura D-MEM (sem açúcar) (GIBCO) e foram finalmente cultivados por 15 dias em meio de cultura D-MEM (sem açúcar) GIBCO suplementado com 1 mM de ácido láctico. Uma vez que a concentração *in vivo* do ácido láctico aumenta até cerca de 4 mM sob a condição fisiológica, a concentração do ácido láctico de "1 mM" usada no método desse Exemplo fica dentro da faixa fisiológica.

A aparência das massas celulares depois do cultivo por 15 dias está mostrada na Figura 17. Conforme mostrado na Figura 17, foi demonstrado a partir desse resultado que a estrutura tipo bolha formada das células consistia dos cardiomiócitos como células viáveis. Em outras palavras, Figs. 17A a C mostram que os cardiomiócitos formando a estrutura tipo bolha fo-

ram seletivamente viáveis no meio de cultura sob uma condição de suplemento sem açúcar + ácido láctico (1 mM). Figura 17A mostra que uma parte de ou todos os corpos embrióides com transparência ótica grandemente reduzida já sofreram morte celular. Também nos casos dos corpos embrióides mostrados na Figura 17B e na Figura 17B', as células com a estrutura tipo bolha na superfície do corpo embrióide foram viáveis. Figura 17C é uma vista amplificada da Figura 17B.

Os corpos embrióides obtidos dessa forma foram cultivados por 3 a 7 dias no mesmo volume do mesmo meio de cultura (sem bFGF). Os cardiomiócitos viáveis reiniciaram a pulsação autonômica. Depois de alcançar o estado estabilizado, as células mortas foram separadas dos cardiomiócitos pela agitação dos corpos embrióides na presença da collagenase tipo III 0,1% (Worthington) por 10 minutos a 37°C. As células mortas foram eliminadas pelo método revelado no Exemplo 8. Os corpos embrióides obtidos dessa forma foram aderidos numa placa de cultura de células revestida com fibronectina (Sigma) (Figura 18, esquerda). Depois da fixação com 4% de paraformaldeído, os corpos embrióides foram marcados com o anticorpo antiactinina (Sigma) como no Exemplo 8 e foram marcados com o anticorpo anti-Nkx2.5 (Santa Cruz) como no Exemplo 4 (Figura 18, à direita, respectivamente).

Como resultado, foi demonstrado que os cardiomiócitos foram seletivamente obtidos pelo cultivo das células-tronco embrionárias de sagüi sob uma condição sem açúcar/sem soro e suplementada com ácido láctico.

EXEMPLO 14. Transplante dos cardiomiócitos derivados de células-tronco embrionárias de sagüi primatas no coração de um camundongo imunodeficiente e confirmação do seu enxerto

Esse Exemplo visa estudar o transplante dos cardiomiócitos derivados das células-tronco embrionárias de sagüi primatas no coração e enxerto no corpo.

Os cardiomiócitos de sagüi purificados preparados pelo método do Exemplo 13 foram suspensos numa solução tamponante com pressão osmótica fisiológica (NaCl 116 mM, Hepes 20 mM, NaH₂PO₄ 12,5 mM, glicose 5,6 mM, KCl 5,4 mM, MgSO₄ 0,8 mM, pH 7,35) suplementada com cola-

genase tipo III 0,2% (Wortington) e *Trypsin* 0,125% (GIBCO). A solução suplementada foi tratada, durante a agitação, por 20 minutos a 37°C numa seringa acoplada com uma agulha de medida 29 (Terumo). Cerca de 1 a 30 pequenas massas celulares consistindo nos cardiomiócitos foram preparadas para uso para o transplante. 100 µL do tampão acima com concentração de sal fisiológica contendo os cardiomiócitos foram aspirados.

Um camundongo NOD-SCID macho de 7 semanas de idade, camundongos imunodeficientes (Clea Japan, Inc.) foram anestesiados por inalação do anestésico FORANE (isoflurano) (Abbott Japão). A seguir, o tórax do camundongo foi aberto sob controle de respiração de um respirador artificial usando intubação intra-traqueal. Uma agulha de injeção foi inserida na parede do coração exteriorizada na direção do ápice cardíaco para a base cardíaca, e a seguir cerca de 30 µL da solução suspensa por sítio foi injetada na parede do tecido cardíaco. A seguir o tórax do camundongo foi fechado, a anestesia terminou e o camundongo continuou sustentado.

Depois de 15 dias do transplante, o coração do camundongo foi extirpado sob anestesia, o qual foi fixado em paraformaldeído 4%. Seções congeladas de 10 µm de espessura foram preparadas e imunomarcadas usando um anticorpo anti-Nkx2.5 de cabra (Santacruz) como anticorpo primário e um anticorpo anti-cabra de macaco Alexa 488 (desenvolvido em verde) (Molecular probes) como o segundo anticorpo (Figura 19B), ou imunomarcadas usando um anticorpo anti-sarcômero-actinina de camundongo (Sigma) como um anticorpo primário e um anticorpo anti-camundongo de coelho – Alexa 594 (desenvolvido em vermelho) (Molecular probes) como o segundo anticorpo (Figura 19D).

Por outro lado, um anticorpo de antígeno anti-humano nuclear de camundongo (o qual reage com qualquer antígeno nuclear em toda a espécie de primata) (Chemicon) e um anticorpo anti-camundongo de cabra – Alexa 633 (Molecular probes) reagem juntos *in vitro* para formar um complexo. Depois um soro de camundongo normal foi usado para inibir a reatividade do excesso de anticorpo anti-camundongo de cabra – Alexa 633 (infravermelho). O complexo de anticorpo preparado dessa forma reagiu com as

seções congeladas acima para desenvolver três cores (Figs. 19B a 19D).

Todas as imagens de imunomarcacão foram tomadas usando um microscópio confocal (Carl Zeiss). Os resultados estão mostrados na Figura 19.

- 5 Como resultado, foi demonstrado que as células com um núcleo maior mostradas na figura foram derivadas de sagüi. Em outras palavras, foi demonstrado nessa figura que algumas células primatas expressando Nkx2.5, um marcador indicador específico para os cardiomiócitos, foram vistas nos cardiomiócitos marcados com Actinina. Isso significa que os cardiomiócitos derivados de células ES de sagüis foram enxertadas com sucesso no coração do camundongo.

EXEMPLO 15: Seleção e preparação dos cardiomiócitos derivados de células-tronco embrionárias humanas sob uma condição sem açúcar/sem soro e suplementada com ácido láctico

- 15 Esse exemplo visa o estudo do efeito complexo da depleção de soro e da depleção de açúcar nas massas celulares (os corpos embrióides) contendo os cardiomiócitos, mais especificamente o efeito complexo da depleção de soro e da depleção de açúcar na seleção dos cardiomiócitos das massas celulares (os corpos embrióides) derivados de células-tronco embrionárias humanas, pelo cultivo das massas celulares (os corpos embrióides) num meio de cultura sem soro e sem açúcar.

- 25 Células-tronco embrióides humanas foram obtidas do Centro de Pesquisa de Células-tronco (Stem Cell Research Center) (Institute for Frontier medical Sciences, Universidade de Kyoto) (o Centro para as células ES baseado no Projeto de Biorrecursos Nacional (National Bioresource Project)). As células-tronco embrionárias humanas foram cultivadas durante a manutenção do estado não-diferenciado usando os fibroblastos embrionários de camundongo inativados de crescimento (MEF), os quais foram tratados com um tratamento com mitomicina C. A cultura foi conduzida usando um meio de cultura [F12/DMEM (1:1) (SIGMA, número do produto D6421), KO-SERUM 20% (GIBCO), L-glutamina 1,6 mM, aminoácidos não-essenciais 0,1 mM (MEM), β -mercaptoetanol 0,1 mM (2-ME; Sigma), penicilina 100 UI/mL,
- 30

sulfato de estreptomicina 100 µg/mL e um fator de crescimento de fibroblasto básico humano recombinante (bFGF, Peprotech)]. Na passagem, colagenase tipo III 0,1% (Worthington) foi usada a 37°C por 10 minutos para separar as colônias de ES.

- 5 Subseqüentemente, para separar MEF e ES um do outro, a solução foi passada através de uma malha com poros de 40 µm, deste modo obtendo massas celulares as quais poderiam não passar através da malha com poros de 40 µm de diâmetro. Essas massas celulares foram purificadas de células ES. Na diferenciação, as massas celulares contendo de
- 10 50 a 1.000 células ES por uma EB foram cultivadas como um corpo embriônico por um total de 15 a 30 dias usando o método da placa bacteriana (usando o meio de cultura descrito acima, exceto pela ausência de bFGF), a seguir para diferenciar nos corpos embriônicos contendo os cardiomiócitos. Para eliminar os açúcares o quanto antes possível do meio de cultura, os corpos embriônicos foram transferidos para um tubo de centrifuga, foram lavados
- 15 cinco vezes com meio de cultura D-MEM (sem açúcar) (GIBCO, número de produto 11966) e foram finalmente cultivados por 15 dias em meio de cultura D-MEM (sem açúcar) (GIBCO, número de produto 11966) suplementado com 1 mM de ácido láctico. Uma vez que a concentração *in vivo* de ácido láctico aumenta até cerca de 4 mM sob as condições fisiológicas, a concentra-
- 20 ção de ácido láctico de "1 mM" usada no método desse Exemplo fica dentro da faixa fisiológica.

- As aparências das massas celulares cultivadas sob uma condição contendo açúcar (condição de controle) e as massas celulares cultivadas por 15 dias sob uma condição sem açúcar para a seleção de cardiomiócitos (condição seletiva de cardiomiócitos) estão mostradas na Figura 20,
- 25 painel esquerdo, como imagens de contraste de fase. Para demonstrar se essas células são viáveis ou não, as células foram marcadas com TMRM (Molecular Probes), as quais podem detectar o potencial de membrana (um indicador de células viáveis) e gerar fluorescência dependendo do potencial de membrana (Figura 20, painel direito). Conforme mostrado na Figura 20,
- 30 painel superior, todas as células embriônicas do grupo da condição contendo

açúcar (controle) geraram fluorescência (isto é, todos os corpos embrióides são compostos de células viáveis); enquanto isso, conforme mostrado na Figura 20, painel inferior, as massas celulares as quais não geram fluorescência (isto é, as massas celulares consistindo em células mortas) apareceram pelo cultivo sob a condição sem açúcar (seleção de cardiomiócitos). Além disso, todas as massas celulares as quais foram viáveis sob a condição sem açúcar (seleção de cardiomiócitos) apresentaram pulsação autonômica.

Os corpos embrióides obtidos dessa forma foram cultivados por 3 a 7 dias no mesmo volume do mesmo meio de cultura (sem bFGF). Os cardiomiócitos viáveis reiniciaram a pulsação autonômica. Depois de alcançar o estado estabilizado, as células mortas foram separadas dos cardiomiócitos pela agitação das células embrióides na presença de colagenase tipo III 0,1% (Worthington) por 10 minutos a 37°C. As células mortas foram eliminadas pelo método revelado no Exemplo 8. A seguir, os corpos embrióides foram aderidos numa placa de cultura revestida com fibronectina (Sigma).

Depois da fixação com 4% de paraformaldeído, os corpos embrióides foram marcados com o anticorpo antiactinina (Sigma) como no Exemplo 8 e foram marcados com o anticorpo anti-Nkx2.5 (Santacruz) como no Exemplo 4 (Figura 21). Conforme mostrado nessa figura, os núcleos celulares marcados com DAPI (Figura 21a) foram necessariamente sobrepostos com os núcleos celulares imunomarcados com o anticorpo anti-Nkx2.5, um marcador indicador específico para os cardiomiócitos (Figura 21c). Quando numa imagem imunomarcada com o anticorpo antiactinina, outro marcador indicador específico para os cardiomiócitos (Figura 21d) foi fundido com uma imagem imunomarcada com o anticorpo anti-Nkx2.5, foi descoberto que as células imunomarcadas com o anticorpo anti-Nkx2.5 foram completamente sobrepostas com as células imunomarcadas com o anticorpo antiactinina (Figura 21e).

É claramente demonstrado a partir desse resultado que, quando células-tronco embrionárias humanas são purificadas pelo cultivo sob uma condição de cultura sem açúcar/sem soro e suplementada com ácido láctico, os cardiomiócitos podem ser seletivamente coletados.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para selecionar cardiomiócitos a partir de uma mistura de células contendo cardiomiócitos e não-cardiomiócitos derivados de células-tronco embrionárias, células-tronco adultas ou fetos, em que a referida
5 mistura de células é cultivada no meio de cultura sob as seguintes condições:

(i) uma condição suplementada com pouca glicose; e

(ii) uma ou mais condições selecionadas do grupo consistindo em uma condição com pouco cálcio, uma condição pouco nutricional, uma
10 condição suplementada com ácido láctico, uma condição suplementada com ácido aspártico/ácido glutâmico e uma condição suplementada com ácido pirúvico.

2. Método para selecionar cardiomiócitos, de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda a etapa de eliminar células mortas aderidas aos cardiomiócitos usando colagenase.
15

3. Método para selecionar cardiomiócitos, de acordo com a reivindicação 2, em que as células mortas são eliminadas baseando-se no fato de que o peso específico das células mortas é maior do que o dos cardiomiócitos.

20 4. Método de seleção de cardiomiócitos, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, em que a condição (ii) do meio de cultura é uma condição suplementada com ácido láctico.

5. Método de seleção de cardiomiócitos, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, em que a condição (ii) do meio de
25 cultura é uma condição suplementada com ácido aspártico/ácido glutâmico.

6. Método de seleção de cardiomiócitos, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, em que a condição (ii) do meio de cultura é uma condição suplementada com ácido pirúvico.

7. Método de seleção de cardiomiócitos, de acordo com a reivindicação 1, em que a mistura celular é preparada pelos seguintes passos de:
30 induzir a diferenciação das células-tronco embrionárias;
formar corpos embrionários compreendendo cardiomiócitos pro-

gramados (células do mesoblasto não-diferenciadas);

preparar a mistura celular pelo cultivo dos corpos embrióides no meio de cultura sob uma condição suplementada com pouco soro e/ou uma condição de pH brandamente ácida.

- 5 8. Método de seleção de cardiomiócitos derivado das células-tronco embrionárias, em que os cardiomiócitos são selecionados seguindo as etapas de:

10 induzir a diferenciação das células-tronco embrionárias para formar corpos embrióides compreendendo células do mesoblasto não-diferenciadas;

a seguir preparar uma mistura celular compreendendo cardiomiócitos programados pelo cultivo dos corpos embrióides no meio de cultura sob uma condição suplementada com pouco soro e/ou uma condição de pH brandamente ácida; e

- 15 continuar a cultura da mistura celular no mesmo meio de cultura para obter os cardiomiócitos.

20 9. Método para selecionar cardiomiócitos, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, em que a condição suplementada com pouca glicose é uma condição sem açúcar, ou uma condição em que o conteúdo de açúcar é reduzido até menos de 1% em comparação com a condição de açúcar do meio de cultura usado para indução de diferenciação.

25 10. Método para selecionar cardiomiócitos, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, em que a condição de pouco cálcio é uma condição em que a concentração de cálcio no meio de cultura varia de 0,3 a 1,3 mM.

30 11. Método para selecionar cardiomiócitos, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, em que a condição pouco nutricional é uma condição em que, ao usar um meio de cultura selecionado do grupo consistindo em meio de cultura RPMI, meio de cultura DMEM, meio de cultura MEM, meio de cultura F12 e meio de cultura MEM como meio de cultura, os conteúdos de cada componente nutricional incluído no meio de cultura são reduzidos até 10% ou menos em comparação com os conteúdos de ca-

da componente nutricional originalmente incluído nesses meios de cultura.

12. Método para selecionar cardiomiócitos, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, em que a condição suplementada com ácido láctico é uma condição em que de 0,1 a 5 mM de ácido láctico é
5 suplementado no meio de cultura.

13. Método para selecionar cardiomiócitos, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, em que a condição suplementada com ácido aspártico/ácido glutâmico é uma condição em que de 20 a 100 mg/L de ácido aspártico e de 20 a 100 mg/L de ácido glutâmico são suplementados no meio de cultura.
10

14. Método para selecionar cardiomiócitos, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, em que a condição suplementada com ácido pirúvico é uma condição em que de 0,5 a 5 mM de ácido pirúvico é suplementado no meio de cultura.

15. Método para selecionar cardiomiócitos, de acordo com a reivindicação 8, em que a condição suplementada com pouco soro é uma condição sem soro, ou uma condição em que, quando a concentração de soro ou componentes do soro suplementado no meio de cultura usado no processo para obter células de mesoblasto não-diferenciadas é considerada como
20 100%, a concentração do soro ou dos componentes do soro é reduzida para de 0% a 10%.

16. Método para selecionar cardiomiócitos, de acordo com a reivindicação 8, em que a condição de pH brandamente ácida é uma condição de pH 6,5.

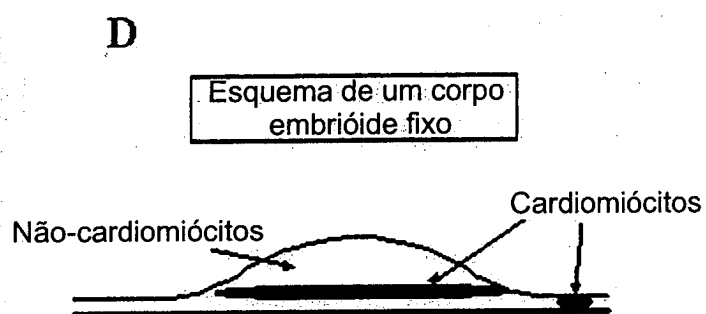
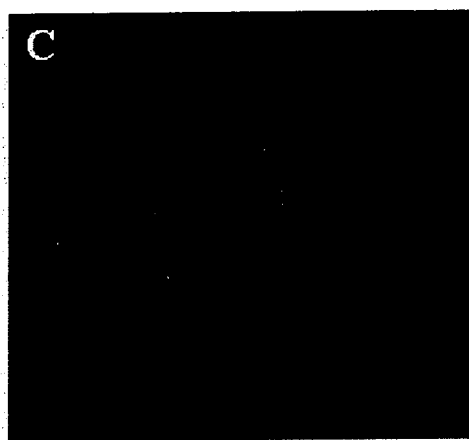
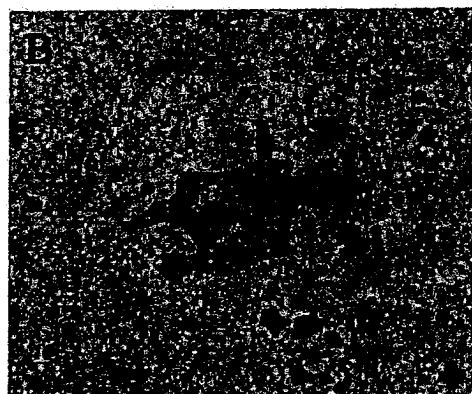
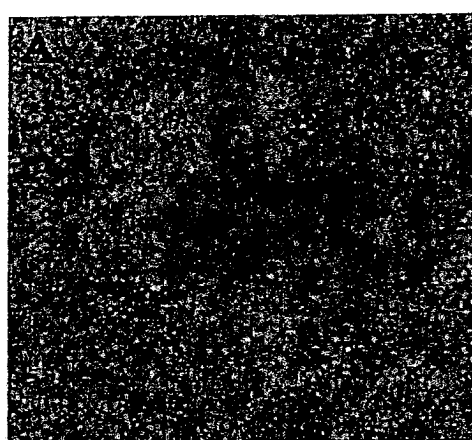


FIG 1

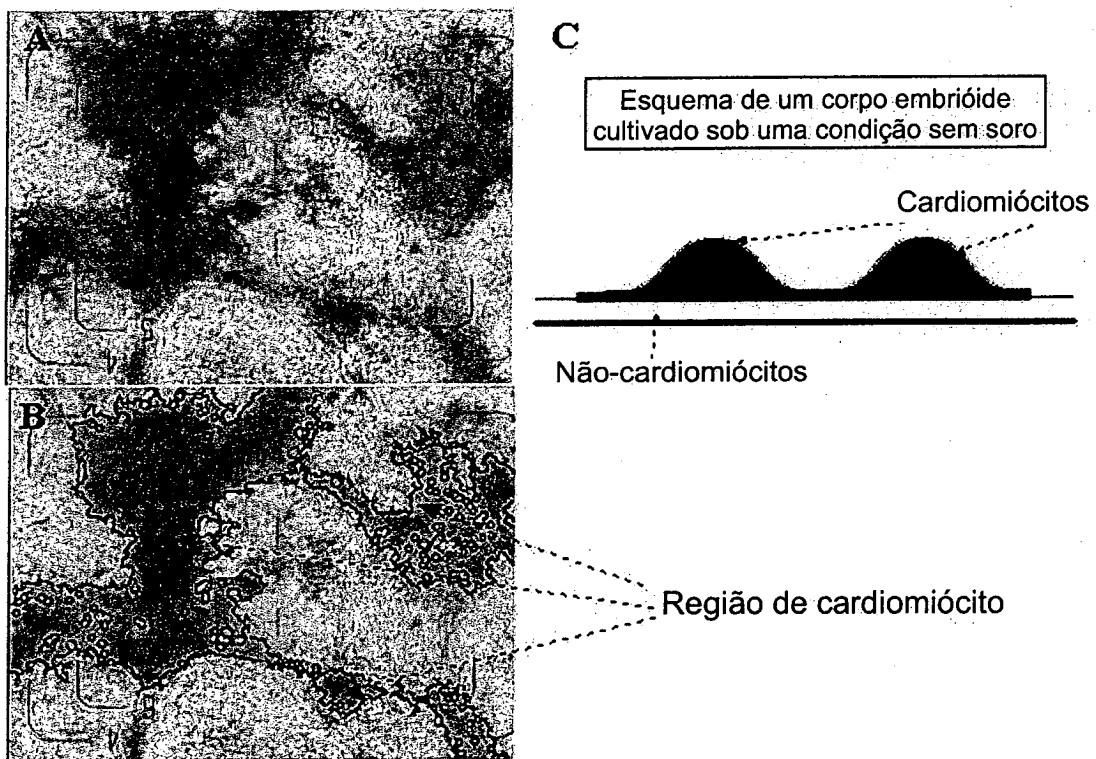


FIG 2

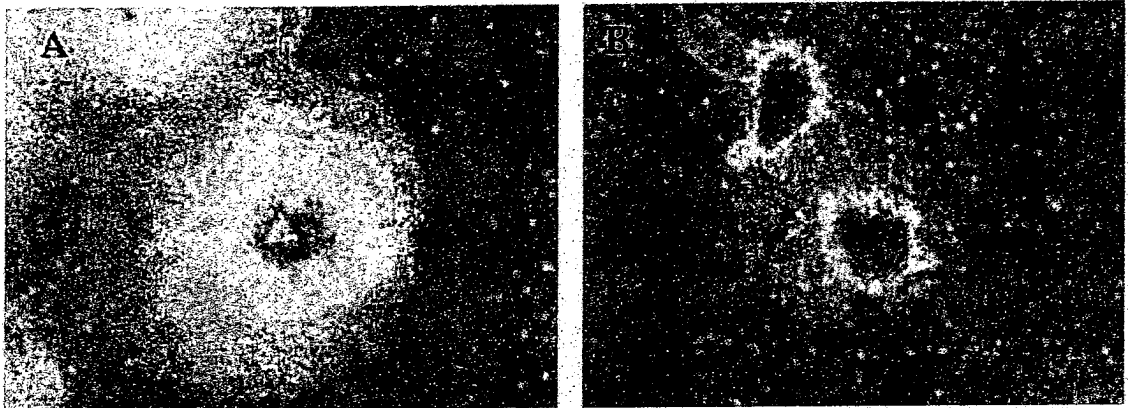


FIG 3

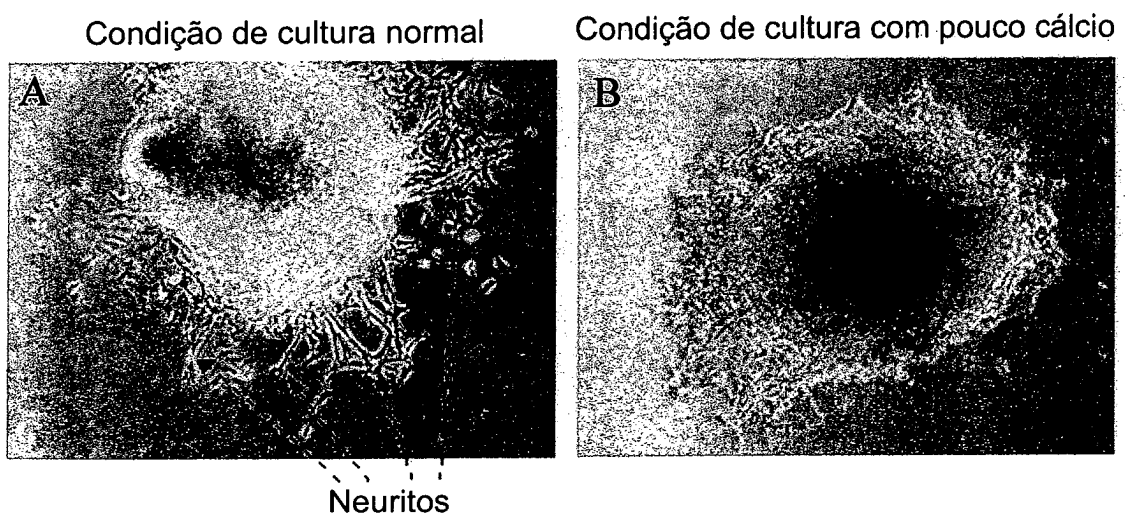


FIG 4

4/22

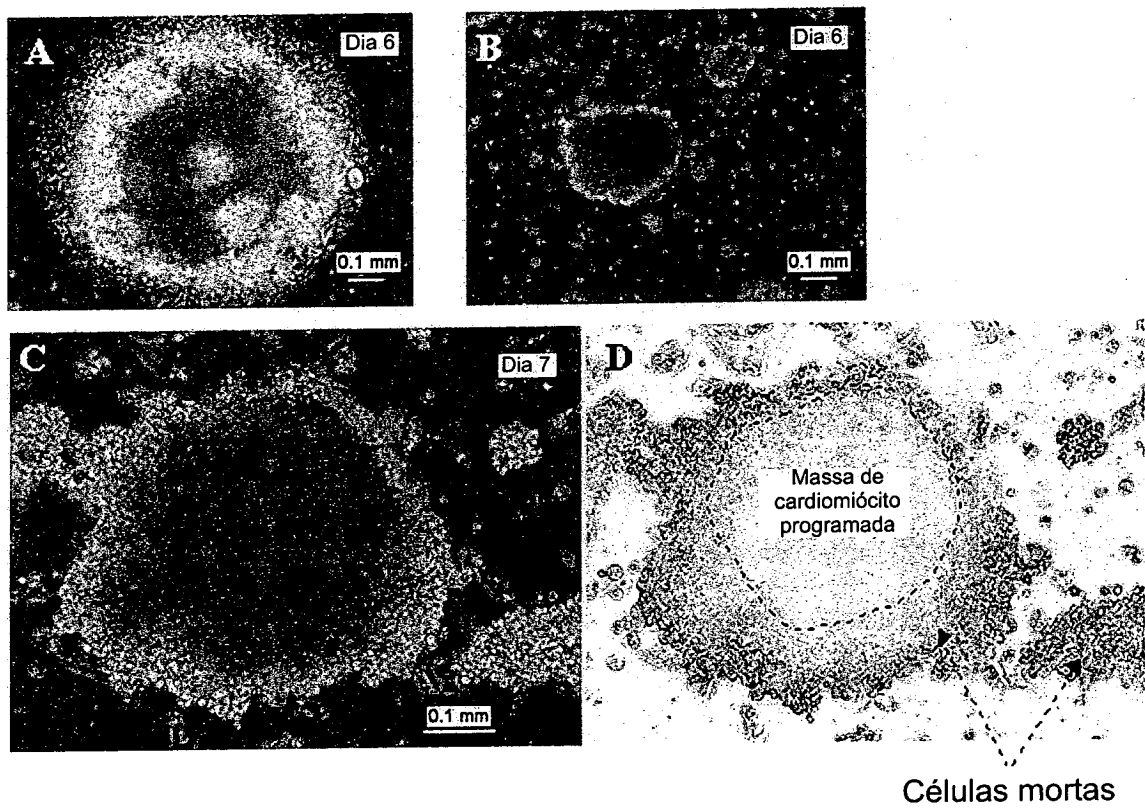


FIG 5

5/22

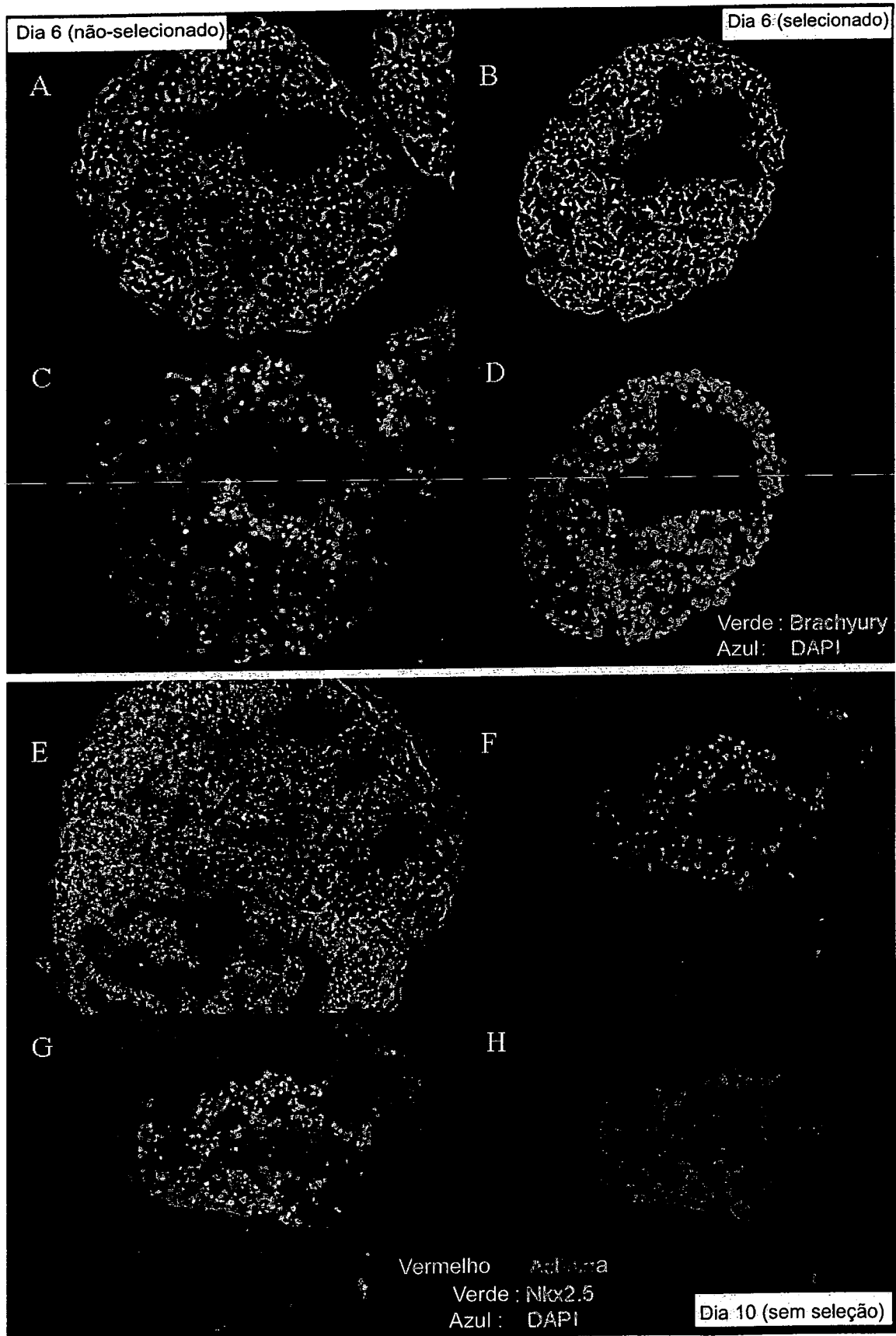


FIG 6-1

6/22

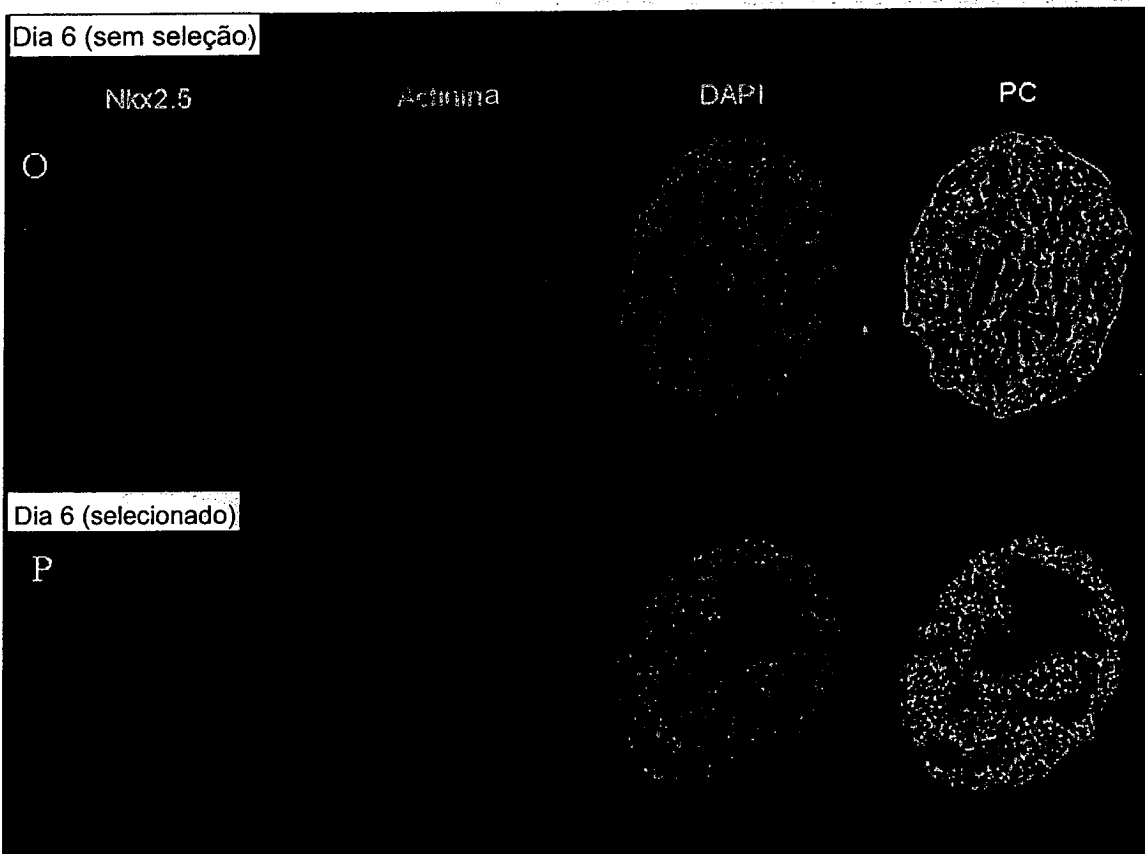
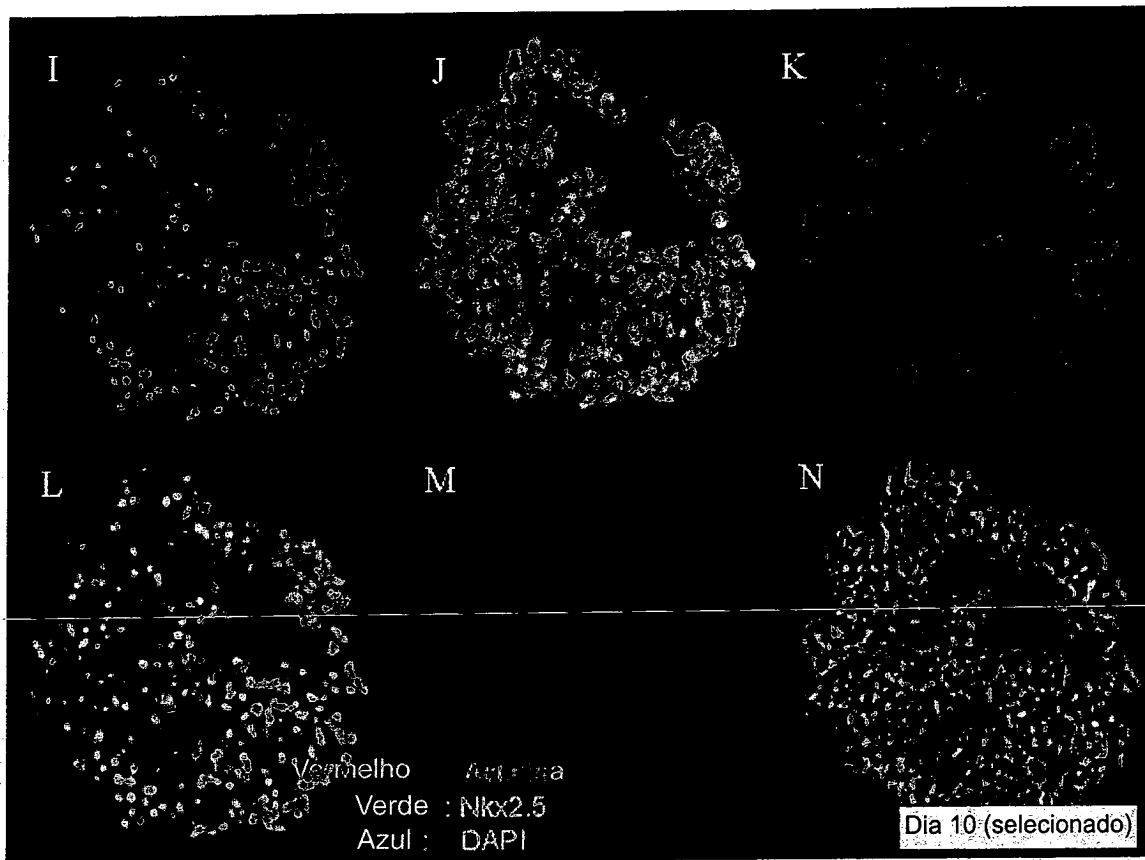
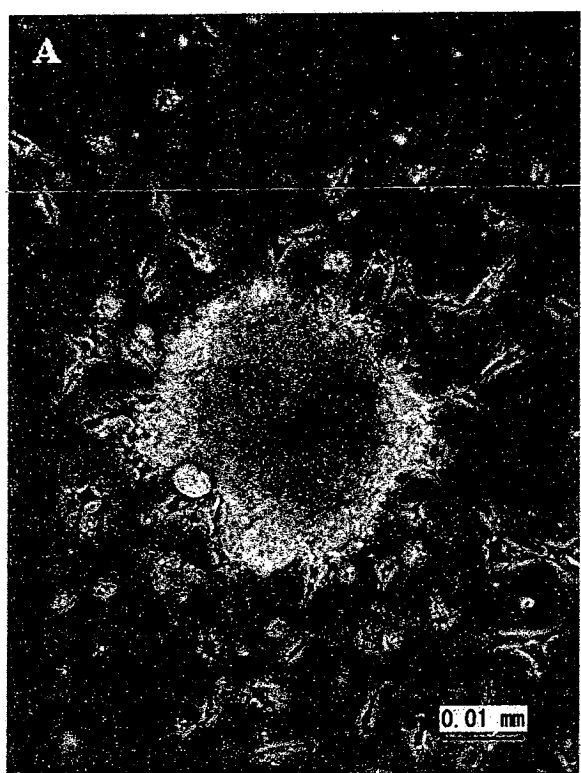


FIG 6-2

7/22



B

Esquema de um corpo embrião cultivado
sob uma condição sem soro/de pH
levemente ácido/com pouco cálcio

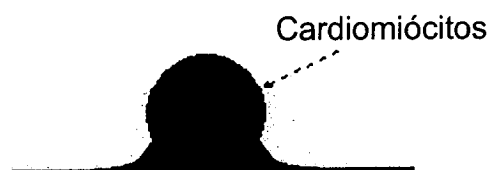
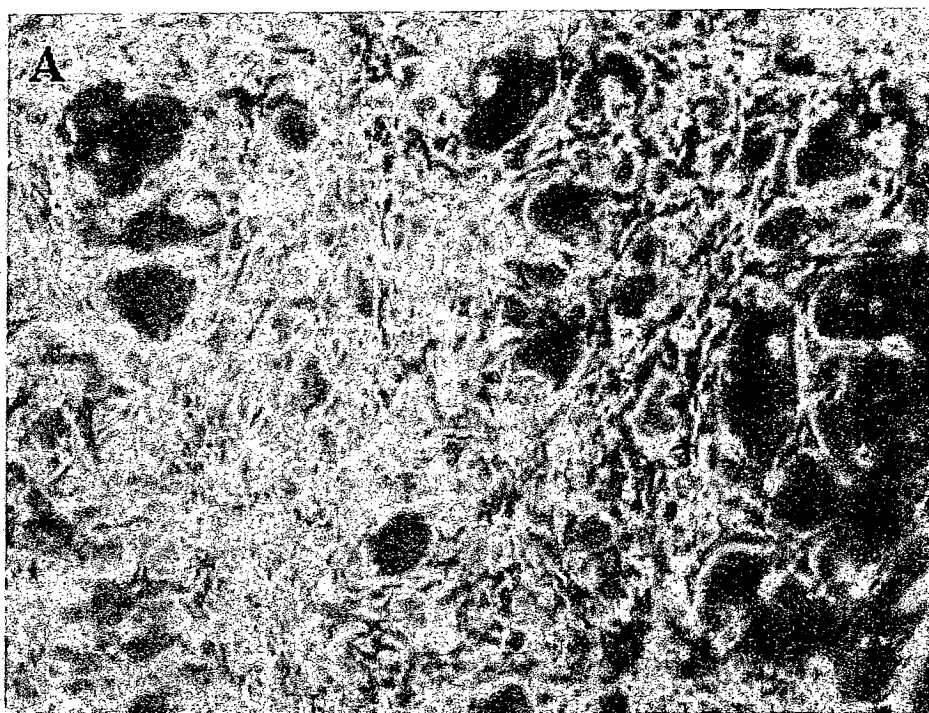


FIG 7

8/22



B

Esquema de um corpo embrião cultivado sob uma
condição sem açúcar e suplementada com ácido láctico

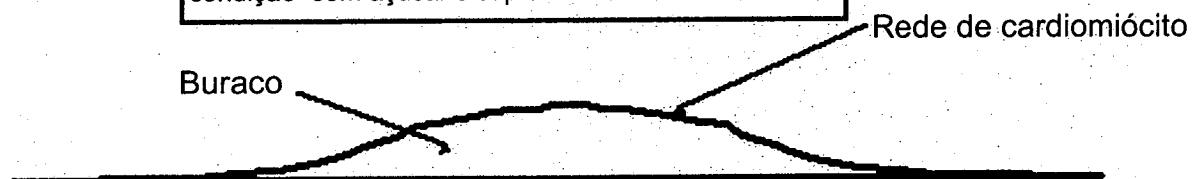


FIG 8

9/22

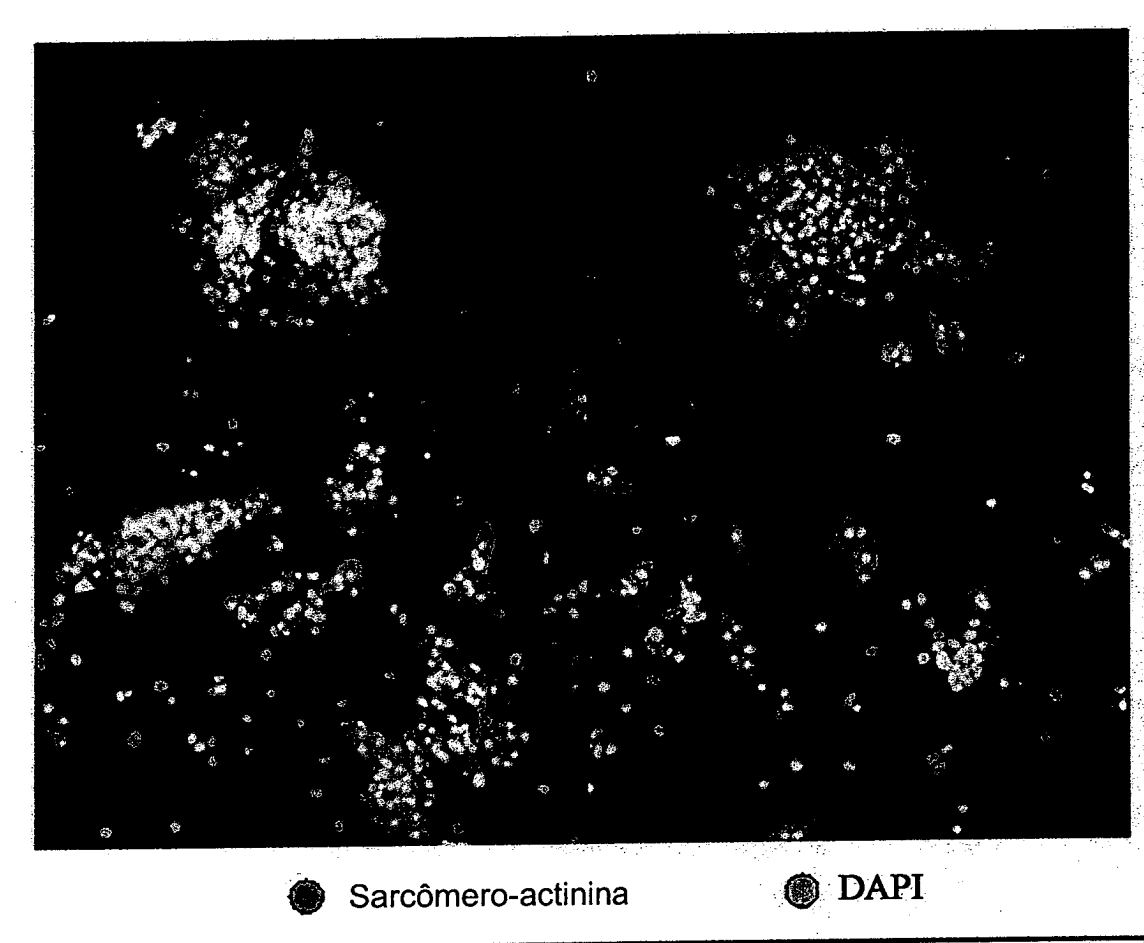


FIG 9

10/22

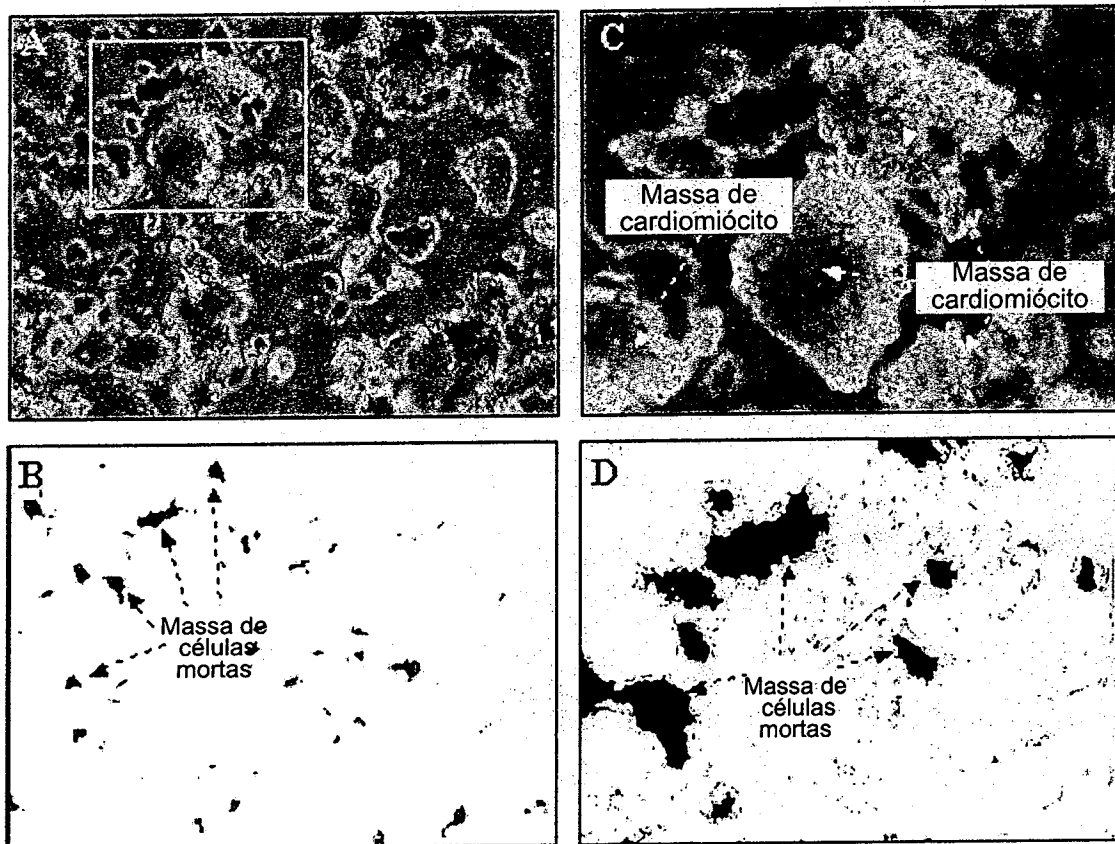


FIG 10

11/22

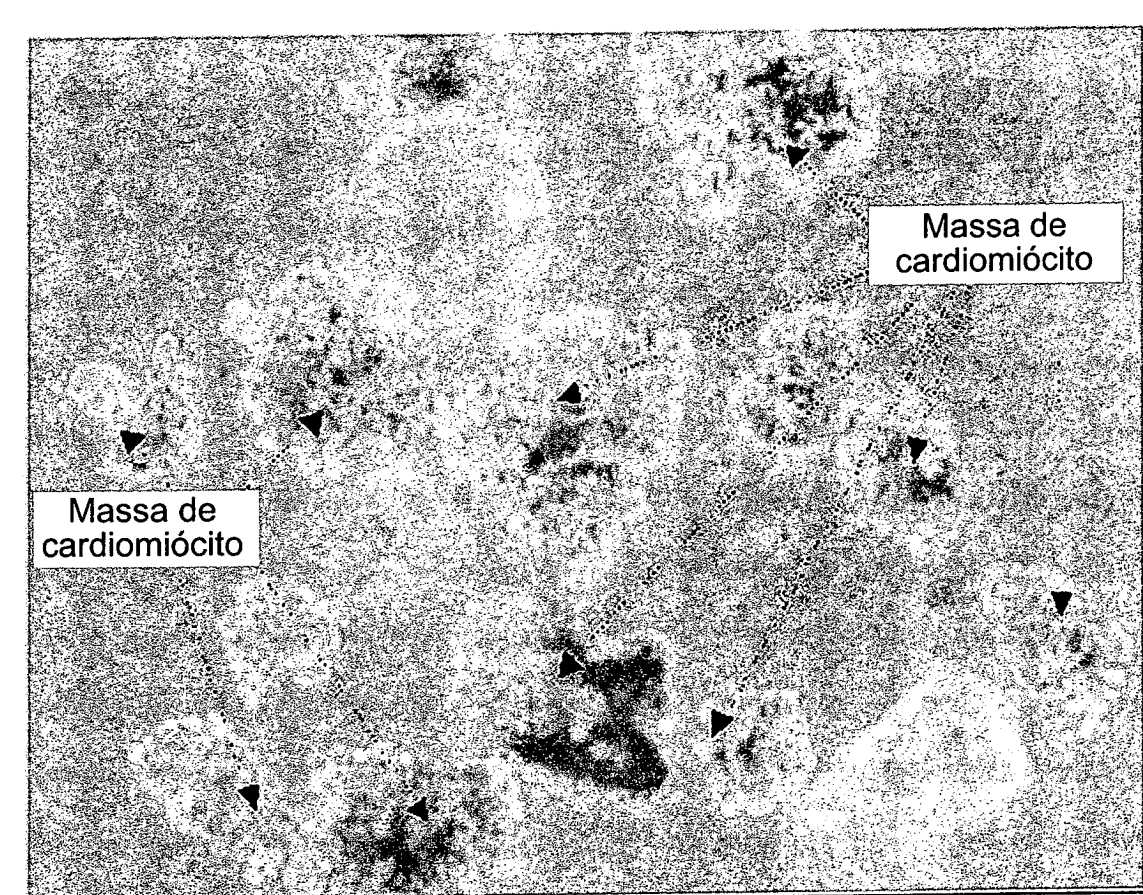


FIG 11

12/22

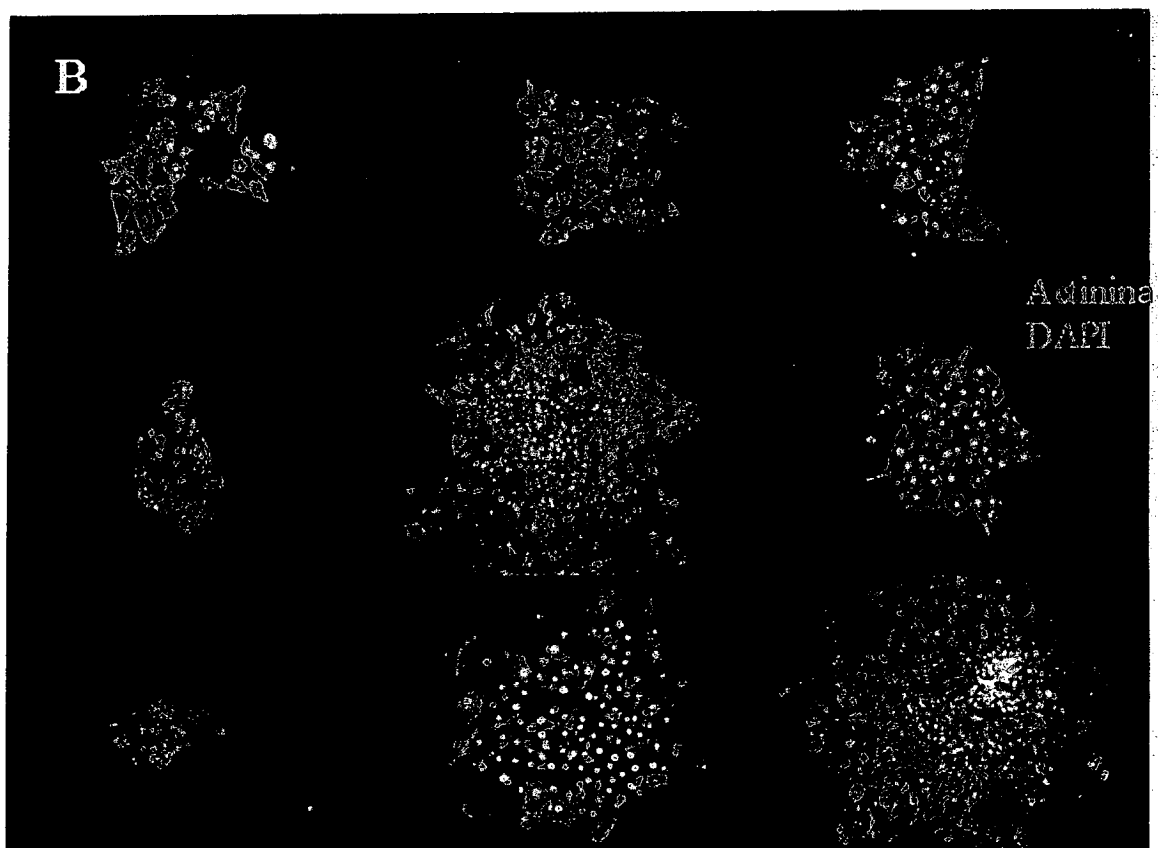
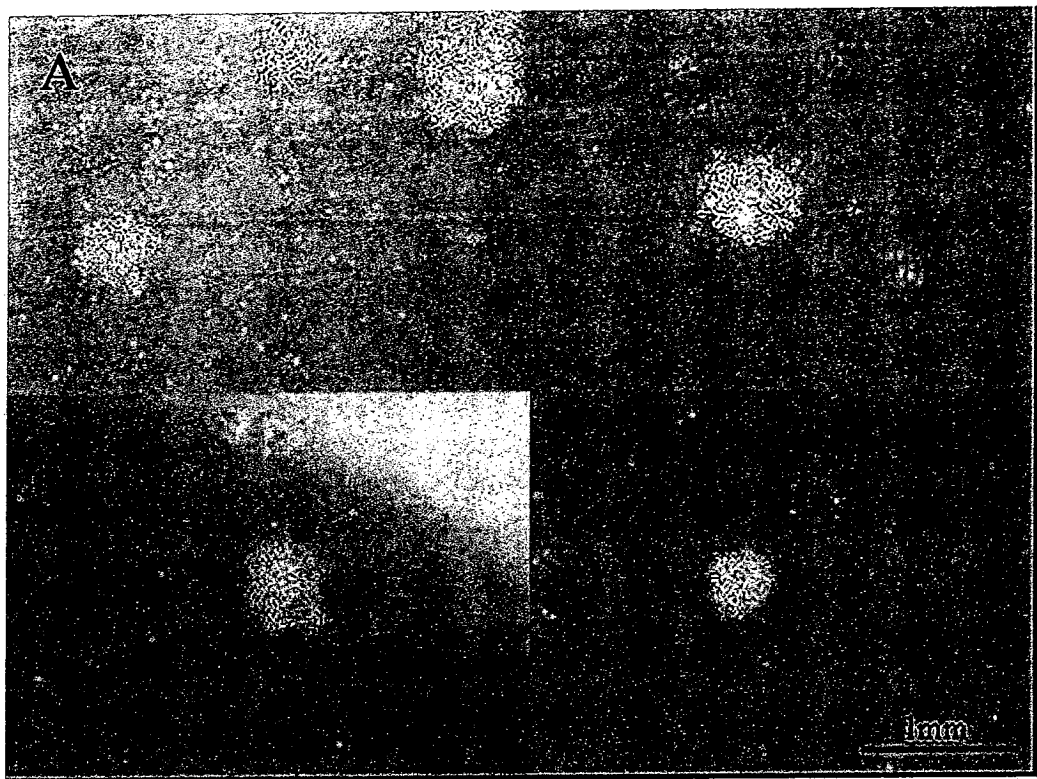


FIG 12-1

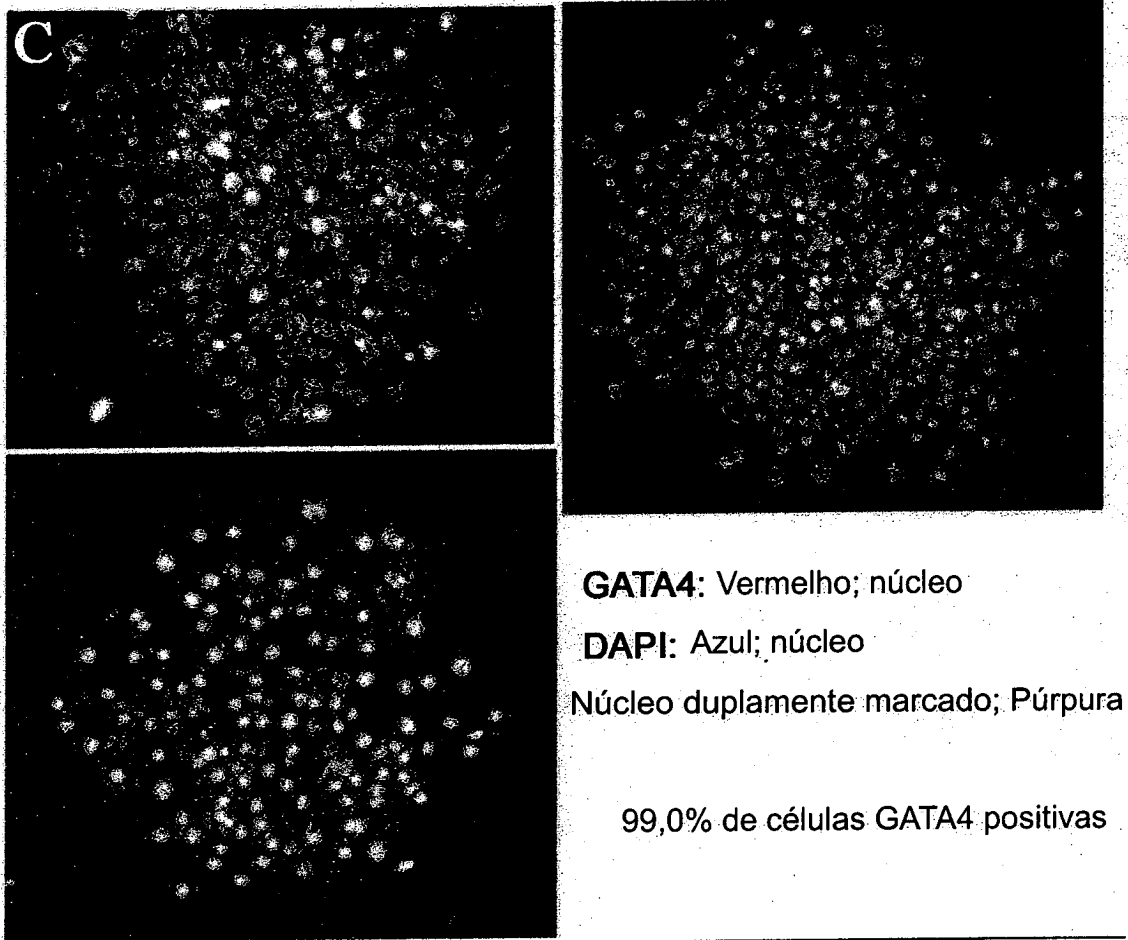


FIG 12-2

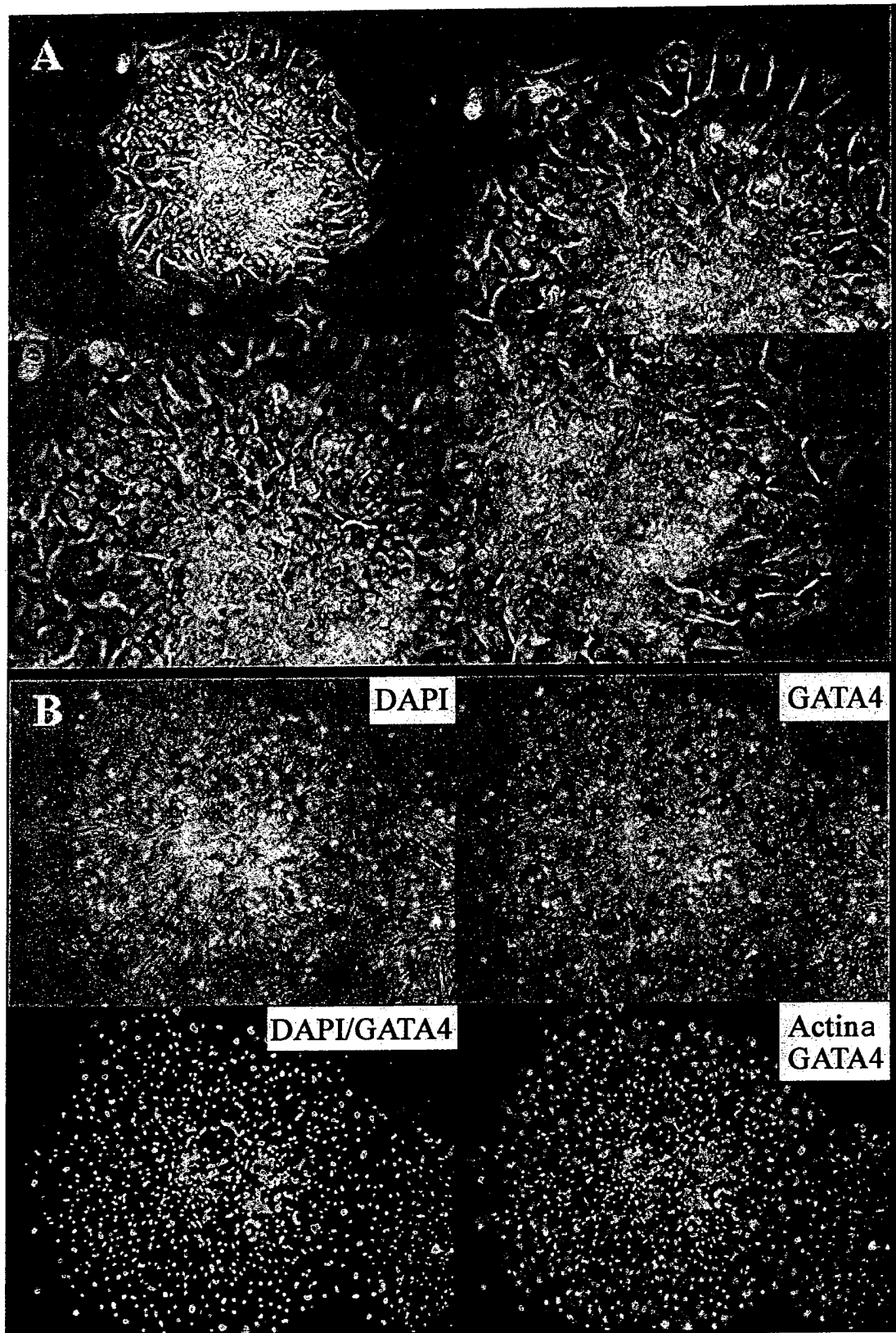
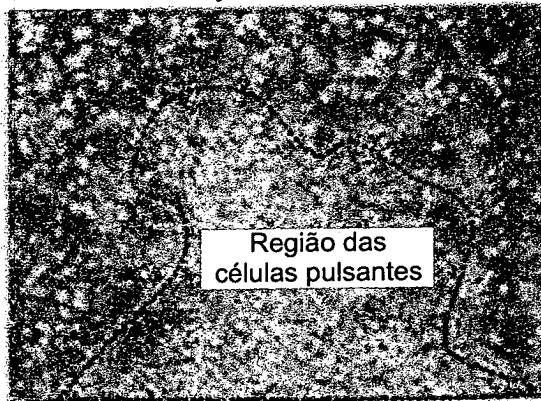
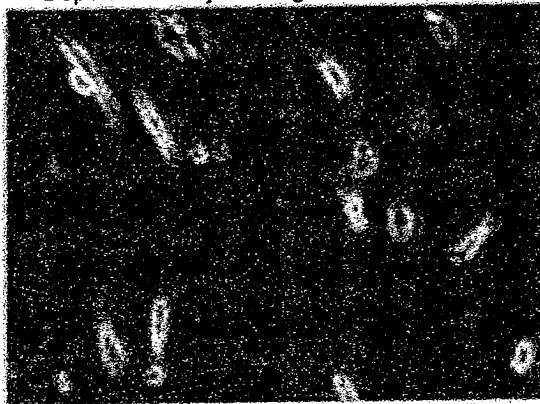


FIG 13

A. Antes da seleção



B. Depois da seleção: imagem do campo brilhante



C. Depois da seleção:

Imagem de imunomarcação fluorescente de sarcômero-actinina

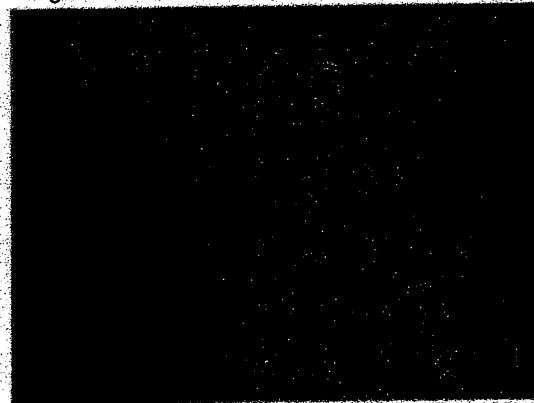
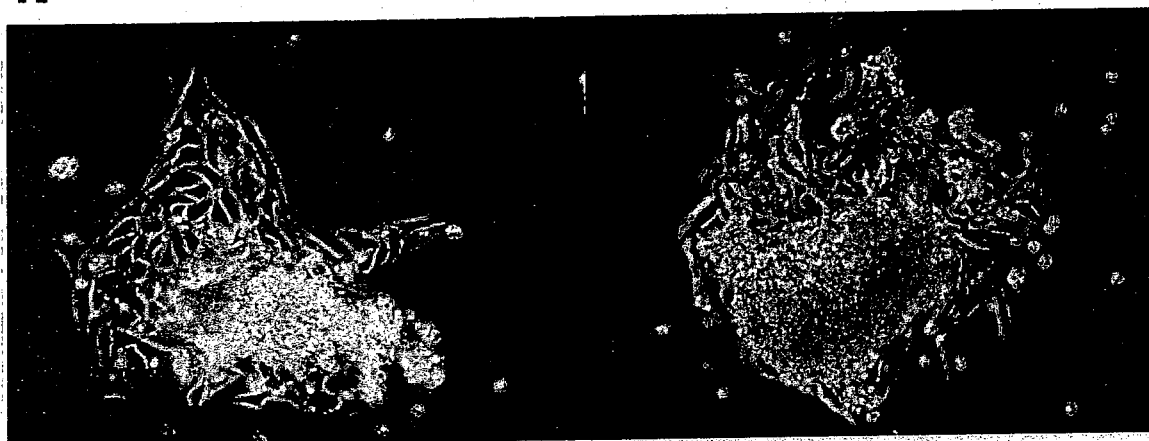


FIG 14

A



B

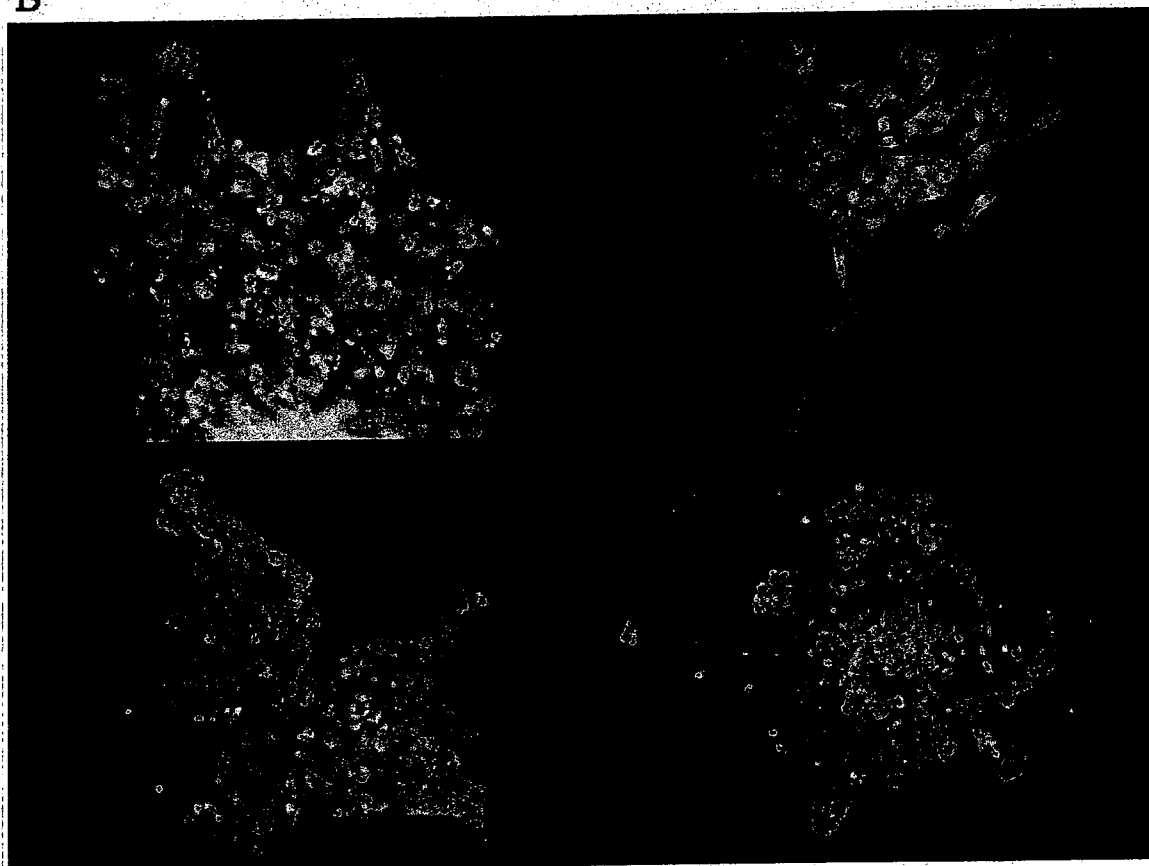


FIG 15

17/22

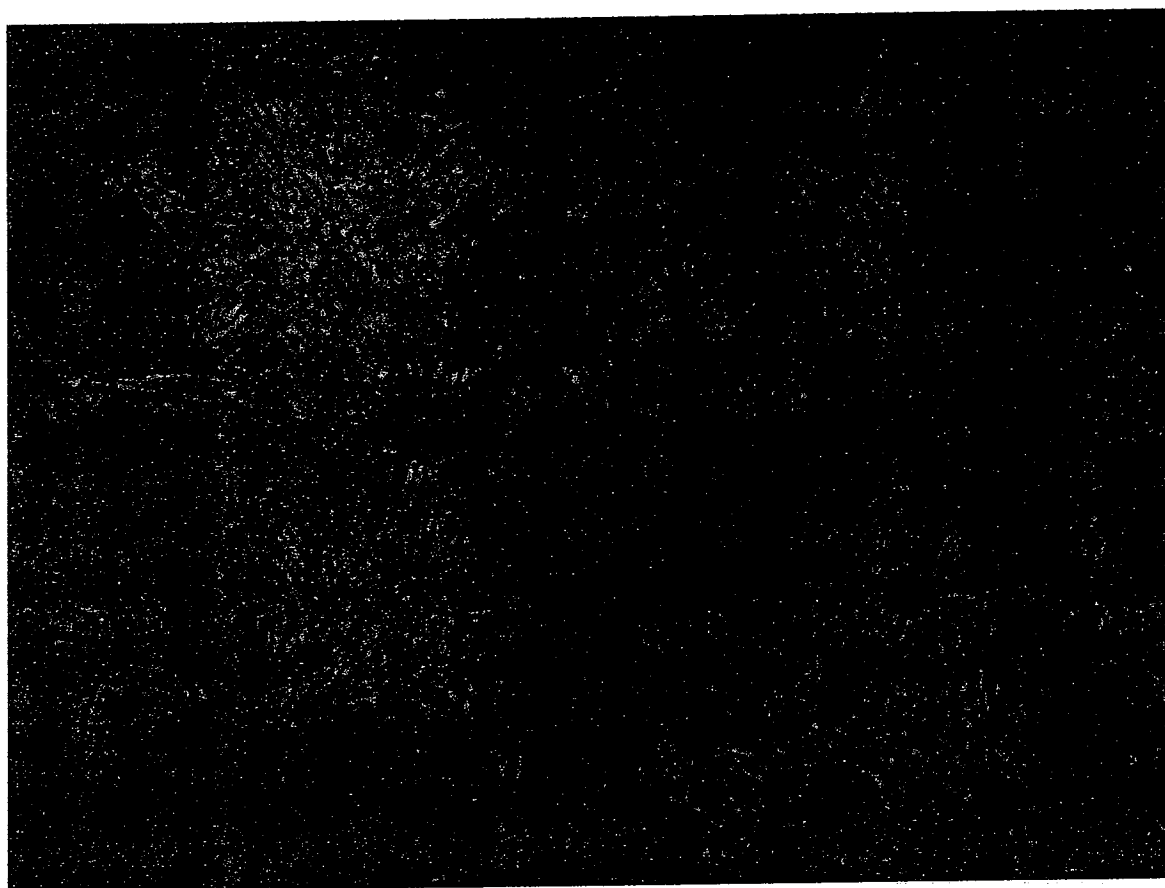


FIG 16

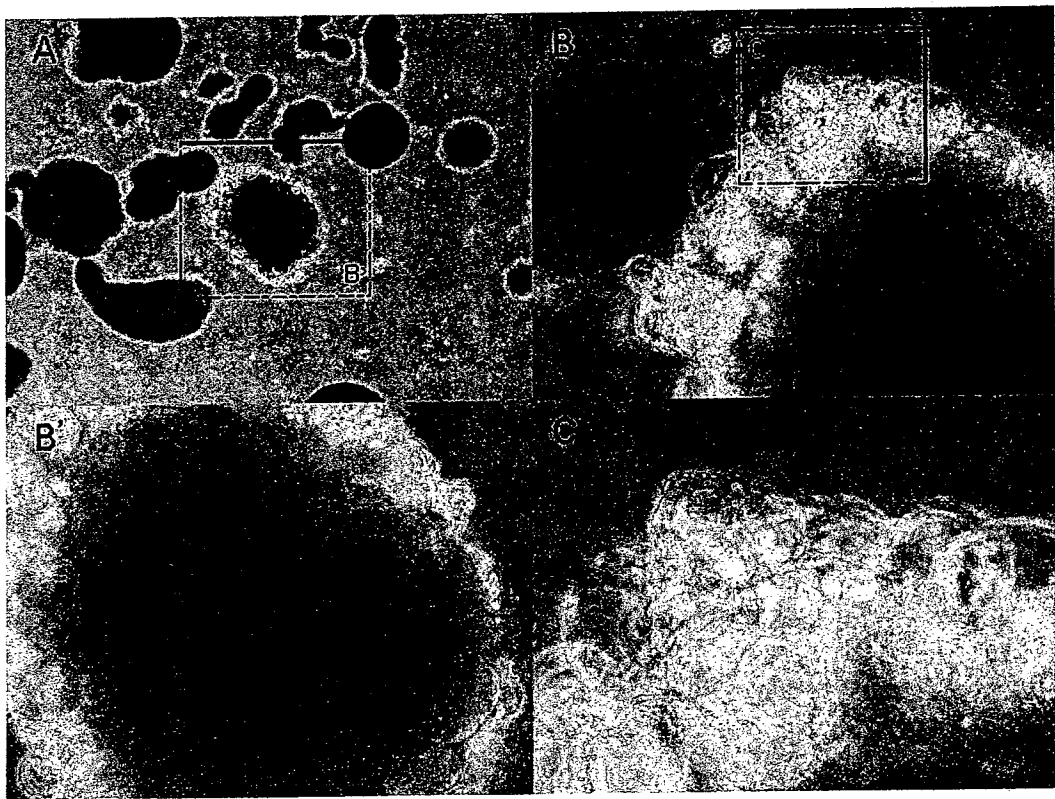


FIG 17

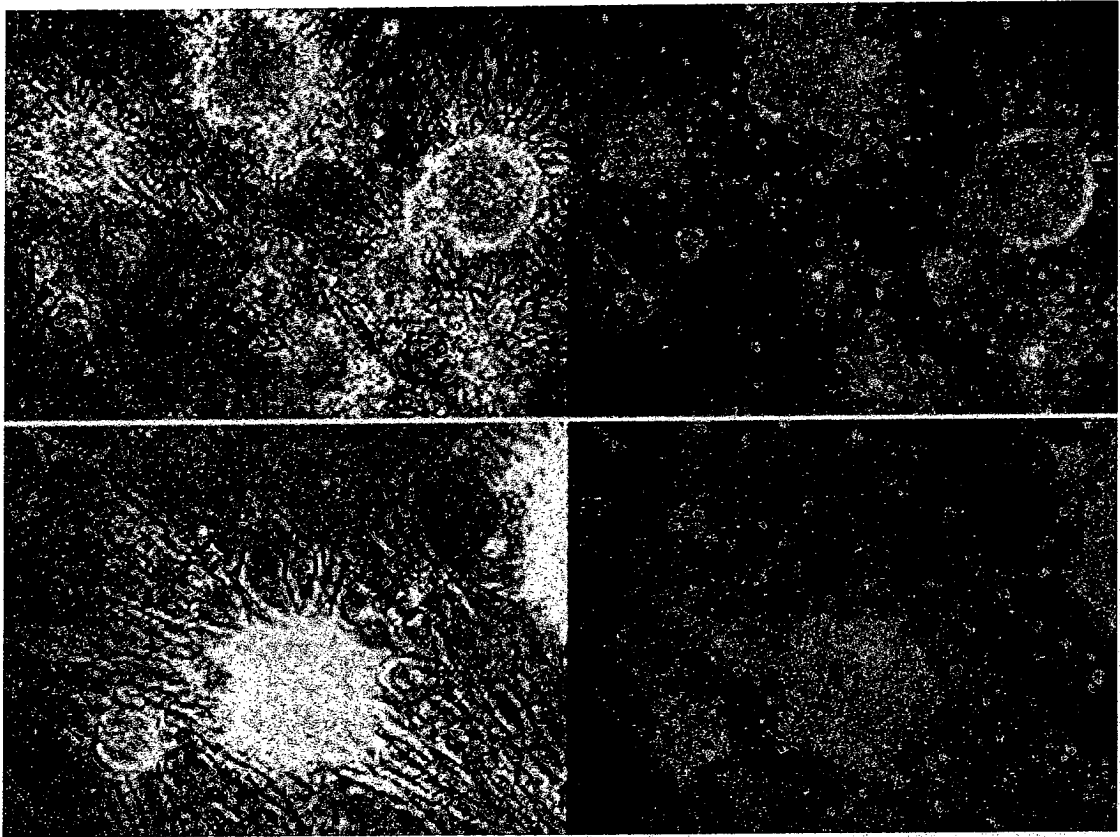


FIG 18

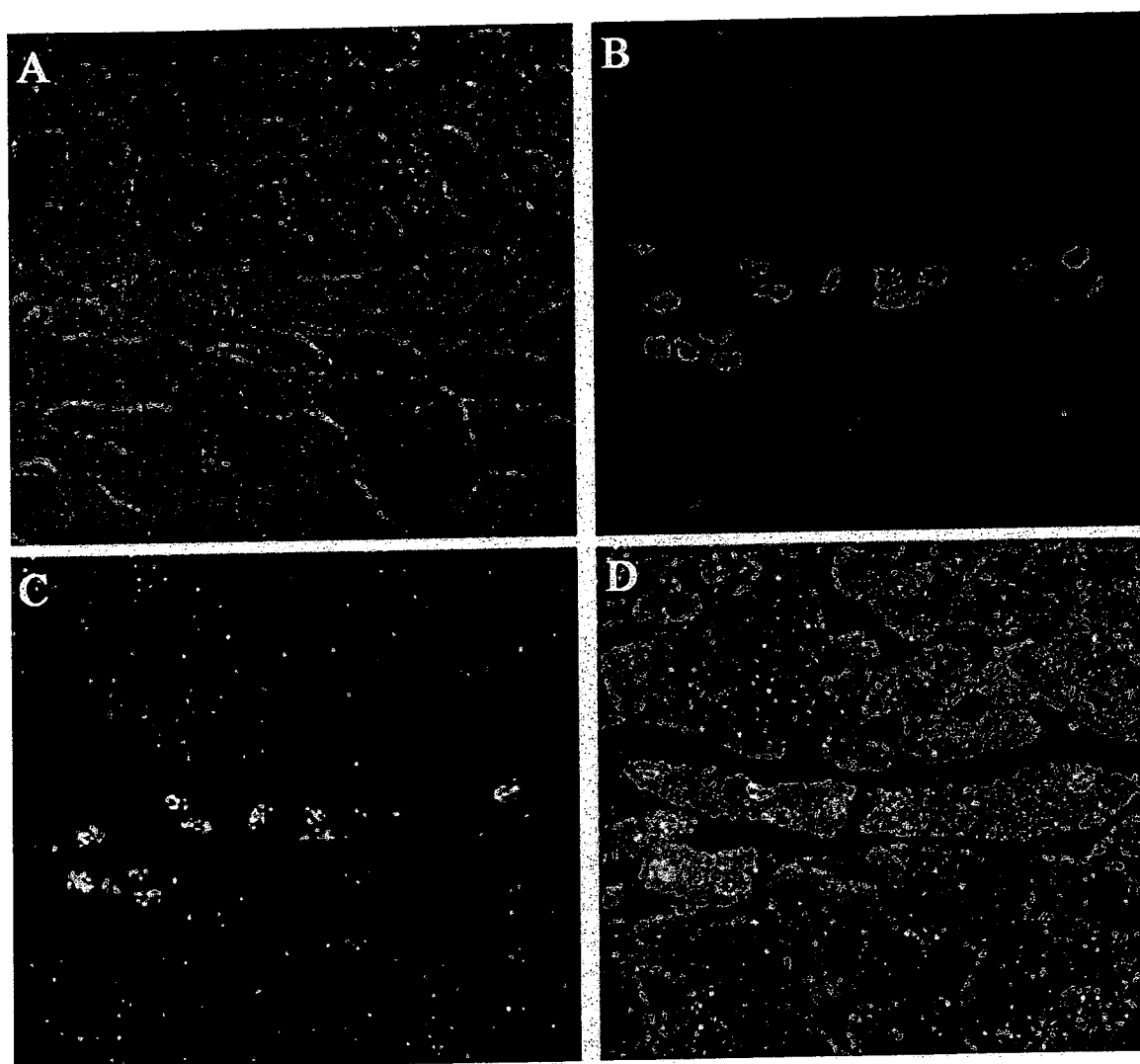


FIG 19

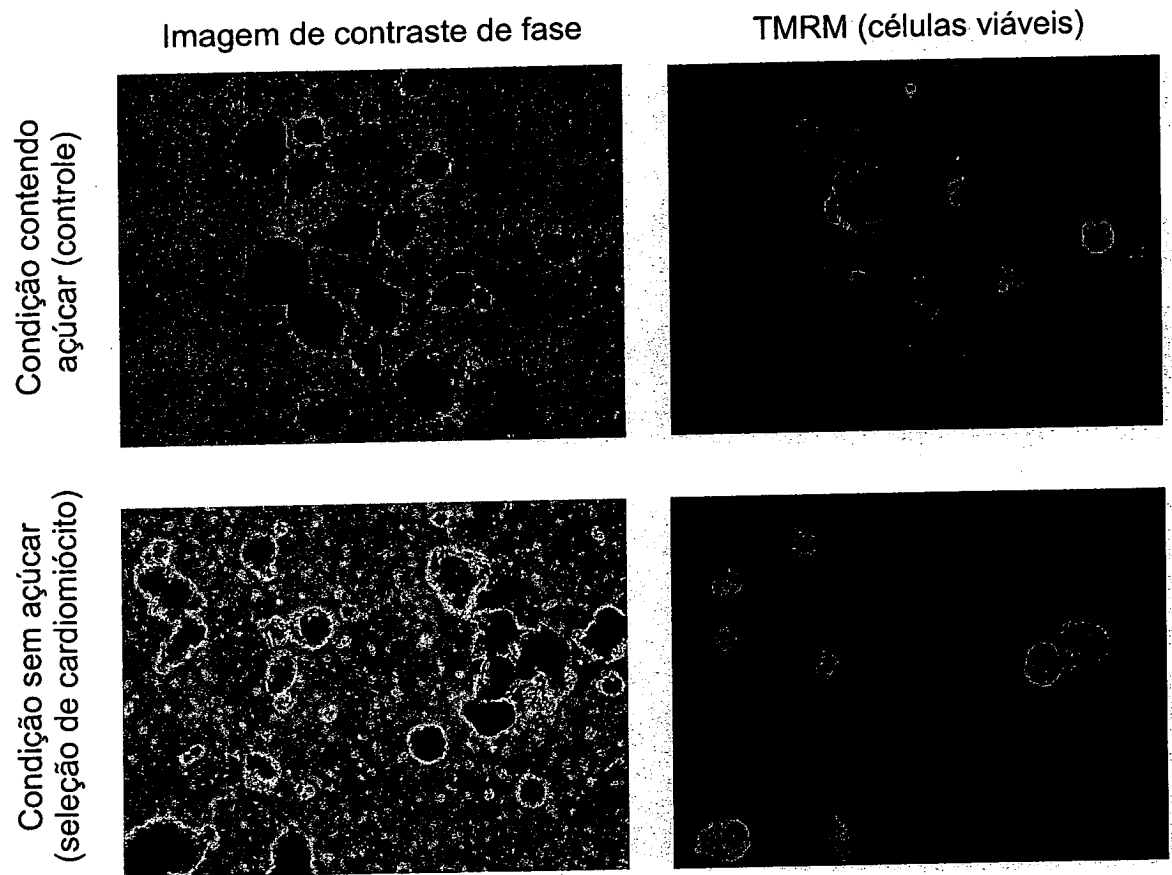


FIG 20

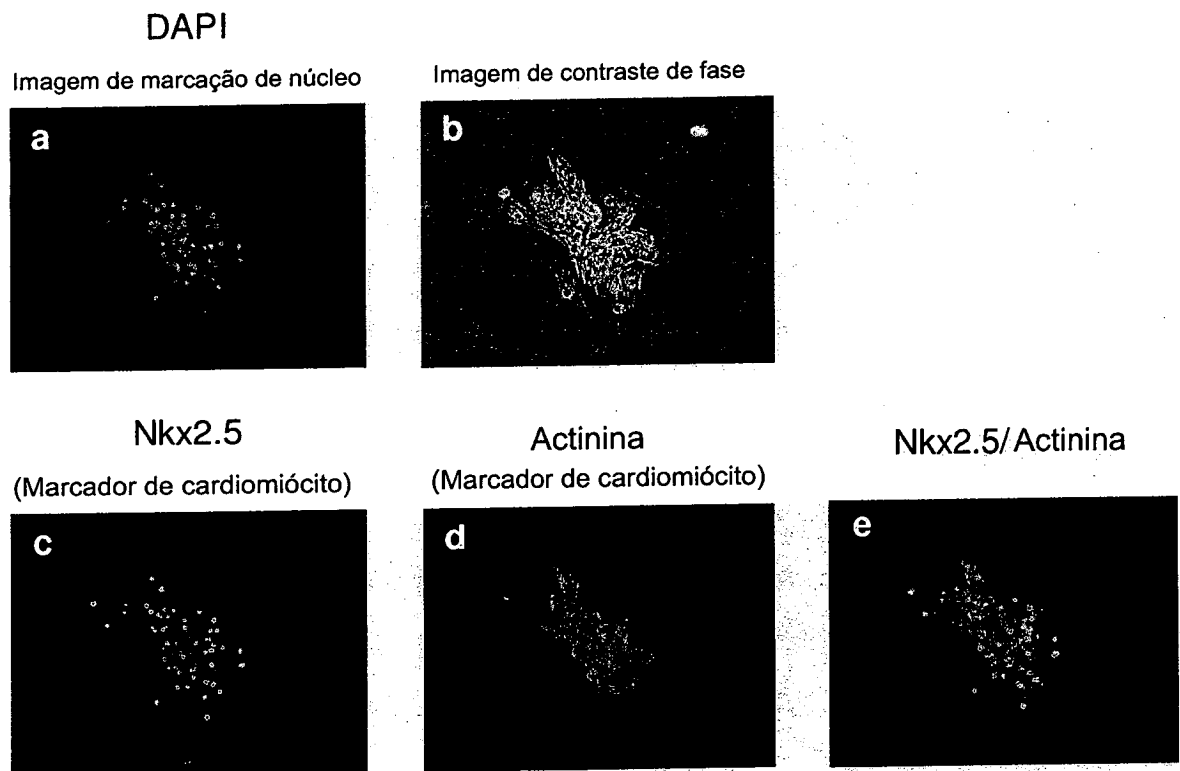


FIG 21

RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DE CARDIOMIÓCITOS OU CARDIOMIÓCITOS PROGRAMADOS DERIVADO DE CÉLULAS-TRONCO OU FETOS".

5 A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de um método para purificar cardiomiócitos com alto grau de purificação e com alto rendimento a partir de uma mistura celular compreendendo cardiomiócitos derivados de fetos e de células-tronco usando várias características as quais não foram anteriormente esperadas para serem usadas para a purificação
10 de cardiomiócitos, ou as quais são recentemente descobertas, em que o referido método é executado sem sofrer qualquer modificação genética ou sem adicionar quaisquer proteínas ou agentes biologicamente ativos especiais.

Os inventores da presente invenção descobriram que os cardiomiócitos foram altamente selecionados e purificados de forma eficaz pelo
15 cultivo de cardiomiócitos derivados de células-tronco embrionárias no meio de cultura sob uma condição selecionada de uma condição selecionada com pouco soro, uma condição suplementada com pouca glicose, uma condição nutricional baixa, uma condição com pouco cálcio, uma condição com pH brandamente ácido, uma condição suplementada com ácido láctico, uma
20 condição suplementada com ácido aspártico/ácido glutâmico e/ou uma condição suplementada com ácido pirúvico. Os inventores da presente invenção ainda descobriram que o método inventado acima, em relação às células-tronco embrionárias, foi aplicável para selecionar e purificar cardiomiócitos derivados de fetos ou de células-tronco adultas.