

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2006.09.28	(73) Titular(es): IPD-THERAPEUTICS B.V. ONDERWIJSBOULEVARD 219 5228 DE'S- HERTOGENBOSCH NL
(30) Prioridade(s): 2005.09.28 EP 05077221	
(43) Data de publicação do pedido: 2008.07.09	(72) Inventor(es): JAN SPANHOLTZ DE
(45) Data e BPI da concessão: 2014.08.20 194/2014	(74) Mandatário: ÁLVARO ALBANO DUARTE CATANA AVENIDA MARQUÊS DE TOMAR, Nº 44, 6º 1069-229 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MÉTODOS E MEIOS PARA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS E SUBSEQUENTE GERAÇÃO E EXPANSÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS, BEM COMO PRODUÇÃO DE CÉLULAS EFECTORAS COMO PRODUTOS TERAPÊUTICOS CLÍNICOS**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO PROPORCIONA MEIOS E MÉTODOS PARA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS E SUBSEQUENTE GERAÇÃO E EXPANSÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS. A INVENÇÃO PROPORCIONA EM PARTICULAR MEIOS E OUTRAS CONDIÇÕES DE CULTURA PARA AS MESMAS. AS CÉLULAS SÃO DE PREFERÊNCIA UTILIZADAS COMO CÉLULAS EFECTORAS COMO PRODUTOS TERAPÊUTICOS CLÍNICOS.

DESCRIÇÃO

"MÉTODOS E MEIOS PARA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS E SUBSEQUENTE GERAÇÃO E EXPANSÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS, BEM COMO PRODUÇÃO DE CÉLULAS EFECTORAS COMO PRODUTOS TERAPÊUTICOS CLÍNICOS"

A invenção refere-se ao campo da biologia médica moderna. Em particular, a invenção refere-se a tecnologia de células estaminais. Mais em particular, a invenção refere-se a tecnologia de células estaminais perinatais, em particular tecnologia de células estaminais do cordão umbilical.

As células estaminais são células indiferenciadas primárias que têm a capacidade de auto-renovação e a capacidade de se diferenciarem em outros tipos de células. Esta capacidade permite que funcionem como um sistema de reparação para o corpo, repondo outras células desde que o organismo esteja vivo.

As células estaminais são classificadas quanto à potência, que descreve a especificidade dessa célula.

Células estaminais totipotentes são células que possuem a capacidade de auto-renovação e são capazes de se diferenciar em qualquer um de todos os tipos de células para formar todo um novo organismo. São tipicamente produzidas a partir da fusão de uma célula ovo com um espermatozóide. As células produzidas pelas primeiras divisões da célula do ovo fertilizado são também totipotentes. Estas células podem tornar-se em qualquer tipo de célula, sem exceção.

As células estaminais pluripotentes são as descendentes das células totipotentes e podem tornar-se em qualquer tipo de célula, excepto células estaminais totipotentes.

As células estaminais multipotentes podem produzir apenas células de uma família de células intimamente relacionada (p. ex. as células estaminais hematopoéticas podem diferenciar-se em células do sangue, tais como glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas).

As células progenitoras (por vezes chamadas unipotentes) podem produzir apenas um tipo de células; mas têm a propriedade de auto-renovação, o que as distingue das células não estaminais.

As células estaminais também são classificadas de acordo com sua origem, como de adulto ou embrionárias.

As células estaminais de adulto são células indiferenciadas que se encontram entre células diferenciadas de um tecido específico e são na sua maioria células multipotentes. São chamadas com mais precisão de células estaminais somáticas, porque não precisam de vir de adultos mas podem também vir de crianças ou cordões umbilicais.

As células estaminais embrionárias são células obtidas a partir das células indiferenciadas da massa interna de um blastocisto, um embrião em fase inicial que tem de 50 a 150 células.

O sangue da placenta e do cordão umbilical que ficam após o nascimento é uma fonte de células estaminais de adulto. É

recolhido através da remoção do cordão umbilical, limpando-o e retirando sangue da veia umbilical.

Os glóbulos vermelhos podem ser removidos do sangue do cordão e as restantes células podem ser utilizadas ou armazenadas (p. ex., em azoto líquido).

As próprias células estaminais são úteis em muitas aplicações da chamada medicina regenerativa. Têm sido utilizadas para tratar doença cardíaca, reparar espinal-medulas e muitas outras doenças onde tecidos de todos os tipos necessitam de ser substituídos.

As células estaminais podem também ser usadas para produzir certos tipos de células diferenciadas que são células efectoras em certas doenças.

Infelizmente, no entanto, as células estaminais estão presentes no corpo de um mamífero apenas em quantidades diminutas. Frequentemente, estão presentes em órgãos ou tecidos que não podem ser facilmente alcançados. As células estaminais embrionárias também não são fáceis de obter e apenas em quantidades diminutas. Além disso, existem algumas preocupações éticas em gerar embriões apenas com a finalidade de produção de células estaminais. Existe a necessidade, portanto, de métodos para multiplicação de células estaminais disponíveis e/ou da descendência específica da linhagem primitiva destas, sem as diferenciar em descendentes menos potentes. As células estaminais totipotentes devem permanecer totipotentes após a expansão e não se tornarem células estaminais pluripotentes, as células estaminais pluripotentes devem permanecer pluripotentes, etc. Nalguns casos, a mudança para um

descendente menos potente pode ser aceitável (pelo menos até um certo ponto) desde que o potencial de auto-renovação e pelo menos a multipotência sejam mantidos.

Embora as células estaminais tenham a capacidade de auto-renovação, a manutenção de células estaminais em cultura não é uma tarefa fácil. No seu sentido mais amplo, a presente invenção proporciona um meio e um método para a cultura e/ou expansão e/ou diferenciação de células estaminais compreendendo vários elementos que são extremamente adequados para esse mesmo fim, com a condição de que as células não sejam células embrionárias humanas. As "células estaminais" da presente invenção não são células embrionárias humanas.

Assim, numa forma de realização, a invenção proporciona um meio para cultura, expansão e/ou diferenciação de células estaminais, o referido meio compreendendo um meio de cultura celular básico, soro humano a 1-20%, O-acetil-L-carnitina a 2-10 mmol/L ou um equivalente funcional desta, heparina N-dessulfatada-N-acetilada a 40-80 mg/L ou um equivalente funcional desta e uma combinação de citocinas adequadas, de preferência englobando três ou mais de trombopoetina, ligando flt-3, factor de células estaminais, G-CSF, GM-CSF, IL-6, MIP-I- α , e LIF, e outros suplementos convencionais, tais como L-glutamina, antibióticos, ácido ascórbico, selenito de selênio e etanolamina. As citocinas dadas são escolhidas pelas suas funções. Para algumas das citocinas dadas existem outras citocinas que serão, pelo menos em parte, capazes de realizar a mesma função. Essas podem então, como é claro, substituir as listadas.

De preferência, um meio de acordo com a invenção compreende cerca de 3-8, de maior preferência cerca de 5 mmol/L de O-acetil-L-carnitina. Um equivalente funcional pode estar presente em diferentes quantidades que sejam equivalentes em actividade às quantidades dadas para a O-acetil-L-carnitina.

De preferência um meio de acordo com a invenção compreende cerca de 50-70, de maior preferência cerca de 60 mg/L de heparina N-dessulfatada-N-acetilada. Um equivalente funcional pode estar presente em diferentes quantidades que sejam equivalentes em actividade às quantidades dadas para a heparina N-dessulfatada-N-acetilada.

As quantidades de citocina adicionadas são convencionais na técnica, as quantidades preferidas são dadas nos exemplos, mas desvios de 10% na quantidade são muito bem aceites e estão dentro do âmbito da presente invenção.

São conhecidos muitos meios básicos. Uma selecção é dada abaixo, mas muitos mais podem ser comprados em empresas tais como Invitrogen. Meios básicos incluem, mas não se limitam a BEM (Meio Básico de Eagle), DMEM (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco), meio essencial mínimo de Glasgow, meio basal M199, F10 de HAM, F12 de HAM, DMEM de Iscove, L15 de Leibovitz, MCDB, 5A de McCoy, etc.

Combinações destes meios básicos podem também ser usadas e combinações de DMEM e F12 de HAM são preferidas para alguns meios de diferenciação de acordo com a invenção. As quantidades aqui indicadas são tipicamente adequadas para culturas que são iniciadas com cerca de 1 milhão de células por mL. As quantidades podem ser adaptadas para diferentes

quantidades de células com as quais as culturas são iniciadas.

Os meios de acordo com a invenção podem ser variados no seu teor de soro, de preferência em conjunto com uma combinação diferente de citocinas para proporcionar um meio de expansão ou um meio de diferenciação.

Assim, numa forma de realização da presente invenção, um meio e um método para proliferação de células estaminais embrionárias não humanas, com subsequente produção de células progenitoras especificadas da linhagem primitiva, particularmente células estaminais de sangue do cordão, são proporcionados numa forma em que a proliferação da célula estaminal produza um célula estaminal filha e uma célula estaminal progenitora primitiva, esta última com extensa capacidade de auto-renovação e maturação funcional. Tipicamente, a partir de 1 milhão de células de uma população enriquecida em células estaminais, podem ser geradas 1×10^8 progenitoras primitivas mantendo o banco de células estaminais. Cada progenitora primitiva é capaz de produzir $>1 \times 10^3$ células efectoras funcionalmente maduras. Da população enriquecida em células estaminais podem ser isoladas células CD34+ e/ou células CD133+. A adição de células CD14+ enriquecidas em monócitos aumenta a amplificação bem como a maturação das células desejadas.

A presente invenção na referida forma de realização proporciona um meio para expansão de células estaminais compreendendo um meio de cultura celular básico, soro humano a 10-20%, O-acetil-L-carnitina a 2-10 mmol/L ou um equivalente funcional desta, heparina N-dessulfatada-N-acetilada a 40-80 mg/L ou um equivalente funcional desta e

uma combinação de citocinas adequadas, de preferência englobando três ou mais de trombopoetina, ligando flt-3, factor de células estaminais, G-CSF, GM-CSF, IL-6, MIP-I- α , e LIF, e outros suplementos convencionais, tais como L-glutamina, antibióticos, ácido ascórbico, selenito de selénio e etanolamina.

De preferência, um meio para expansão de acordo com a invenção compreende cerca de 15% de soro humano, de preferência soro AB. De preferência um meio para expansão de acordo com a invenção compreende cerca de 5 mmol/L de O-acetil-L-carnitina. De preferência um meio for expansão de acordo com a invenção compreende 60 mg/L de heparina N-dessulfatada-N-acetilada. O meio básico preferido é RPMI1640.

Numa outra forma de realização preferida, um meio para expansão de acordo com a invenção compreende trombopoetina, ligando flt-3, factor de células estaminais, G-CSF, GM-CSF, IL-6, MIP-I- α , LIF, VEGF, bFGF, IL-3 e IL-7 em quantidades convencionais, de preferência nas quantidades dadas nos exemplos.

Noutra forma de realização a invenção proporciona meios de diferenciação para diferenciação em progenitoras de células Assassinas Naturais, de preferência dois meios para dois passos na diferenciação, meios para os quais a quantidade de soro humano reside entre 5-10%. De preferência, a quantidade de soro é de cerca de 8%. De preferência, um meio para diferenciação de acordo com a invenção compreende cerca de 5 mmol/L de O-acetil-L-carnitina. De preferência, um meio para diferenciação de acordo com a invenção compreende 60 mg/L de heparina N-dessulfatada-N-acetilada.

O meio básico preferido é uma mistura de 2:1 (v/v) de DMEM e HAM-F12.

Uma combinação preferida de citocinas para o primeiro passo na diferenciação é TPO, FLT-3L, SCF, IL-7, VEGF, IL-2, GM-CSF, G-CSF, LIF, MIP-I- α e IL-6. Este meio é de preferência aplicado após expansão de células estaminais durante cerca de três dias, de preferência expansão num meio de expansão de acordo com a invenção.

De preferência, este primeiro passo de diferenciação em progenitoras de células assassinas naturais é seguido por um outro passo de diferenciação cerca de três dias depois (aos 6 dias desde a colheita ou descongelação) com ainda um meio de diferenciação secundário diferente de acordo com a invenção em que as células devem ser cultivadas durante cerca de 9-24, de preferência 12-22 dias.

Um segundo meio de diferenciação de acordo com a invenção compreende 5-10% de soro humano (de preferência AB), de preferência cerca de 8% de soro humano.

De preferência, um segundo meio de diferenciação de acordo com a invenção compreende cerca de 5 mmol/L de O-acetil-L-carnitina. De preferência, um segundo meio para diferenciação de acordo com a invenção compreende 60 mg/L de heparina N-dessulfatada-N-acetilada. O meio básico preferido é uma mistura de 2:1 (v/v) de DMEM e HAM-F12. Uma combinação preferida de citocinas para o segundo passo em diferenciação é TPO, FLT-3, SCF, IL-7, IL-15, IL-2, GM-CSF, G-CSF, LIF, IL-6, MIP-I- α .

Este meio deve ser refrescado entre 3-8, de preferência cerca de 6 dias.

A invenção engloba também métodos para manutenção enquanto proliferam células estaminais com a geração e expansão de células progenitoras pós-embrionárias, em particular células estaminais de sangue do cordão umbilical, compreendendo a colheita de células estaminais de sangue do cordão, cultura das referidas células num meio de acordo com a invenção e separação das células expandidas a partir do referido meio. A invenção compreende ainda métodos para diferenciação de células estaminais em progenitoras de células NK compreendendo a cultura das referidas células estaminais, em particular células estaminais derivadas de sangue do cordão umbilical, num meio de diferenciação de acordo com a invenção e de preferência cultura das referidas células estaminais num primeiro e num segundo meio de diferenciação num esquema tal como dado na descrição detalhada abaixo. A cultura deve ocorrer sob condições convencionais adequadas, tipicamente englobando temperaturas de cerca de 37 graus Celsius, HR a 100%, O₂ a 10% e CO₂ a 5-7%.

As células estaminais proliferadas e mantidas produzidas através de um processo de acordo com a invenção, são aqui descritas.

As células progenitoras de assassinas naturais produzidas através de um método de acordo com a invenção, são aqui descritas.

Numa outra forma de realização, a invenção compreende um conjunto de meios (estojo de partes) para proliferação e

manutenção de células estaminais, em particular derivados de sangue do cordão umbilical, e geração de células progenitoras de NK primitivas, compreendendo um meio de expansão de acordo com a invenção, um primeiro e um segundo meio de diferenciação de acordo com a invenção e de preferência um folheto de instruções para utilização do meio.

As células progenitoras de NK podem ser diferenciadas em células NK maduras e funcionais reconhecendo um alvo desejado através de receptores específicos à sua superfície conhecidos dos peritos no campo (CD56, CD16, CD107, NKG2a/CD94, antigénios NKp, receptores KIR). Estas células NK maduras e funcionais podem ser geradas *in vitro* através do prolongamento do período de cultura 2-3 semanas mais. No entanto, como terapêutica celular é preferida a injeção das progenitoras primitivas e maturação *in vivo*. Estas células NK podem ser utilizadas no tratamento de qualquer tipo de doença humana, de preferência todas as doenças malignas tais como tumores, cancro, em particular leucemias, cancro do ovário, do cólon e da pele, cancros da Mama, do Cérebro e do Pulmão, cancro do Colo do útero e metástases de todos os tipos de cancro, particularmente do fígado, bem como todas as doenças virais, em particular HIV, HCV, e outras doenças virais crónicas. Os métodos para (expansão e) diferenciação de células estaminais em células progenitoras de NK e em diante em células NK, fazem também parte da presente invenção.

Células NK específicas do alvo produzidas através destes métodos são descritas. Composições farmacêuticas compreendendo células progenitoras ou células NK maduras produzidas de acordo com a invenção e compreendendo ainda

os constituintes habituais de tais composições são aqui descritas. As doses para tais composições farmacêuticas são geralmente expressas no número de células viáveis presente em tal composição. O referido número deve estar entre $1-9 \times 10^6$ NK-IC ou $>1-10 \times 10^8$ células NK maduras por kg de peso corporal de um sujeito a tratar.

Noutra forma de realização, a invenção compreende um meio para diferenciação de células estaminais (expandidas) em progenitoras de células Vasculares.

Nesta forma de realização, um meio de diferenciação (primeiro) preferido compreende um meio básico (de preferência meio basal M199) com cerca de 7-12, de preferência cerca de soro humano a 10% (de preferência AB), cerca de 4-6, de preferência cerca de 5 mmol/L de O-acetil-L-carnitina, cerca de 60 mg/L de heparina N-dessulfatada-N-acetilada.

A seguinte combinação de citocinas é preferida: SCGF, VEGF, Angiopoetina-1, angiopoetina-2, bFGF, IGF, TPO, FLT-3L, II-1 β , GM-CSF, G-CSF, LIF, MIP-I- α e II-6. As quantidades são novamente de preferência as dadas nos exemplos, embora desvios de 10% serão tipicamente aceitáveis. Outros constituintes habituais para meios de cultura tal como dados aqui acima podem, como é claro, ser adicionados.

Prefere-se aumentar ainda mais a diferenciação em células VP através de cultura das células num segundo meio de diferenciação. O esquema preferido é dado na descrição detalhada, embora um tal esquema não seja crítico. A duração dos diferentes passos de cultura pode ser variada.

Este segundo meio de cultura difere principalmente do primeiro na quantidade de soro humano presente, que deveria ser de cerca de 1-4%, de preferência cerca de 2%.

O conjunto preferido de citocinas é SCGF, VEGF, bFGF, IGF, TPO, FLT-3L e IL-1 β .

As células progenitoras vasculares podem ser produzidas através de um método de acordo com a invenção. Estas células podem ser utilizadas para tratamento de qualquer doença cardiovascular envolvendo a geração de novos vasos sanguíneos ou novo endotélio.

Composições farmacêuticas compreendendo células progenitoras vasculares são descritas. A quantidade de células por dose compreenderá tipicamente pelo menos 1×10^6 células viáveis por dose.

Noutra forma de realização, a invenção compreende um conjunto de meios (estojo de partes) para expansão e diferenciação de células estaminais, em particular derivadas de sangue do cordão, em células progenitoras vasculares, compreendendo um meio de expansão de acordo com a invenção, um primeiro e um segundo meio de diferenciação de acordo com a invenção e de preferência um folheto de instruções para utilização dos meios.

Os métodos para diferenciação de células estaminais em células progenitoras vasculares e em diante em novo endotélio funcional e vasos sanguíneos levando à revascularização do tecido são também parte da presente invenção.

A invenção será explicada em maior detalhe na seguinte descrição detalhada.

Descrição detalhada

A seguinte descrição divulga um método *in vitro* de geração de produtos terapêuticos celulares para uso clínico que podem ser derivados de pequenas alíquotas de células estaminais pós-embrionárias. Este procedimento é caracterizado pela cultura de células estaminais pós-embrionárias num meio especificamente formulado com uma composição definida, bem como um procedimento de manuseamento da cultura definido para produzir progenitoras suficientes para aplicação clínica.

A invenção aqui divulgada é, pelo menos em parte, baseada no problema técnico de que para o tratamento de doenças malignas, ou seja, cancro, leucemias e linfomas, bem como para doenças cardiovasculares, a disponibilidade de terapias celulares é muito limitada. Com excepção de muito poucos transplantes de células estaminais hematopoéticas utilizando sangue de cordão umbilical (SCU), as células estaminais pós-embrionárias não têm sido utilizadas para tratamento celular direccionado num cenário de transplante não alogeneico sem condicionamento de elevada dose de quimioterapia/radiação do paciente principalmente devido ao facto de não estarem ainda disponíveis suficientes células progenitoras direccionadas para terapia celular. Além disso, estas células são alo-reativas e causam doença grave de enxerto versus hospedeiro no receptor se o tratamento e o produto celular não forem idealmente escolhidos. O problema técnico foi resolvido, pelo menos em parte, nesta invenção através do proporcionar de

procedimentos praticáveis para gerar números suficientes de progenitoras para tratamentos seleccionados, tal como indicado anteriormente. O problema técnico da geração de progenitoras seleccionadas de células estaminais pós-embriónicas humanas para aplicação clínica pode ser resolvido através da aplicação tanto de procedimentos bem definidos de passos de cultura *in vitro* como de alterações específicas das condições de cultura tal como descrito na secção dos métodos. Estes procedimentos permitem pela primeira vez a produção de progenitoras vasculares (células VP) e/ou progenitoras de células Assassinas Naturais (células NK) para aplicação clínica a partir de pequenas alíquotas de células estaminais pós-embriónicas.

As seguintes células estaminais pós-embriónicas que podem ser obtidas começando a partir da semana 12 após a gestação a partir de fígado fetal, sangue do cordão umbilical (SCU) perinatal, medula óssea humana ou sangue periférico estimulado com G-CSF podem ser isoladas e utilizadas para procedimentos de cultivo de acordo com a invenção. O perito na técnica conhece métodos para a colheita destas células estaminais, em que a colheita a partir do cordão umbilical perinatal ou sangue placentário é preferida para os procedimentos de acordo com a invenção.

Noutra forma de realização preferida dos procedimentos de acordo com a invenção, é realizada uma prova funcional do produto terapêutico celular final consecutivo ao cultivo. Especialmente preferida é a prova das características das progenitoras de Células Assassinas Naturais (células NK) bem como células progenitoras vasculares (células VP) através de sistemas de ensaio *in vitro* estabelecidos.

O seguinte exemplo ilustra a invenção:1. Iniciação da cultura *in vitro*:

Pequenas alíquotas de células estaminais pós-embrionárias (mínimo de 25 mL de sangue do cordão umbilical humano; uma quantidade que está bem abaixo da quantidade mínima necessária para banco clínico) são processadas de acordo com procedimentos operacionais padrão de lise de glóbulos vermelhos para obter células nucleadas para posterior processamento. Como opção, as células podem ainda ser purificadas através de separação celular imunomagnética de acordo com o fabricante (Miltenyi-Biotec, Alemanha) em células enriquecidas em CD34+ (ou alternativamente células CD133+) e adicionalmente células CD14+ podem também ser separadas. O perito neste campo será capaz de realizar estas separações de células de acordo com o fabricante. Estas células são colocadas em balões de cultura ou sacos de Teflon que contêm o chamado meio **Glycostem-Technology-Initiation ou meio GTI**: O meio neste exemplo consiste em RPMI1640 (Invitrogen Inc.) contendo soro AB humano a 15% (Cambrex Inc.), O-acetil-L-carnitina (OALC, Sigma Chemicals) ou derivados numa concentração final de 5 mmol/L, heparina N-dessulfatada-N-acetilada (Seigagaku Amerika Inc.) numa concentração de 60 mg/L. As seguintes citocinas humanas recombinantes (se não for mencionado especificamente, todas as citocinas foram proporcionadas por Stem Cell Technology Inc. ou R&D Systems): trombopoetina (TPO; 25 ng/mL); Ligando flt-3 (FLT-3L; 25 ng/mL), factor de células estaminais (SCF; 25 ng/mL), interleucina-7 (IL-7; 25 ng/mL), factor de crescimento endotelial vascular (VEGF; 10 ng/mL), interleucina-3 (IL-3; 2,5 ng/mL), factor de crescimento de fibroblastos básico

(bFGF; 10 ng/mL), factor de crescimento semelhante a insulina (IGF; 10 ng/mL), factor estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF; 10 pg/mL Immunex Corp., Seattle, WA), factor estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF, 250 pg/mL; Amgen, Thousand Oaks, CA), factor inibidor de leucemia (LIF; 50 pg/mL), proteína inflamatória de macrófagos 1alfa (200 pg/mL; MIP-1 alfa) e interleucina-6 (IL-6; 50 pg/mL). Suplementos adicionais são L-glutamina (2 mmol/L; Invitrogen), penicilina (1.000 U/mL), estreptomicina 100 U/mL (Invitrogen), 2-mercaptoetanol-beta 25 µM (Invitrogen), ácido ascórbico (20 mg/mL, Sigma), selenito de selénio (50 µmol, Sigma), etanolamina (50 µmol, Sigma). A razão final de meio para células inoculadas é de 1×10^6 células totais por 1 mL de meio. A iniciação da cultura pode ser realizada de 2 modos alternativos:

a) inoculação de células nucleadas após lise de glóbulos vermelhos em meio GTI

b) inoculação de células CD34+ separadas (ou alternativamente células CD133+) juntamente com células CD14+ separadas como suplemento em meio GTI a uma razão de 1 célula CD34+ [ou alternativamente células CD133+]:1 célula CD14+)

c) inoculação de células CD34+ separadas (ou alternativamente células CD133+) em meio GTI

As células são cultivadas no meio e a razões acima mencionados sob condições apropriadas. As condições apropriadas exemplares em relação a recipientes de cultura adequados, temperatura, humidade relativa, O_2 e teor de CO_2 da fase gasosa são conhecidas dos peritos. De preferência, as células são cultivadas no meio acima mencionado sob as

seguintes condições: (a) 37°C, (b) 100% de humidade relativa, (c) O₂ a 10% e (d) CO₂ a 5% a 7%.

2. Decisão de diferenciação no dia 3 *in vitro*:

No dia 3 de cultura é realizada a primeira suplementação do meio. Neste ponto, a cultura de suspensão celular é conduzida para diferenciação de células NK ou diferenciação de progenitoras vasculares (VP).

Isto pode ser feito de 2 modos:

a) O produto inteiro é ainda diferenciado em apenas uma das duas vias de diferenciação (diferenciação em NK ou VPC)

b) O produto é dividido conforme necessário e uma alíquota é ainda mais diferenciada em progenitoras de NK, a outra em progenitoras de VPC.

c) As células aderentes são diferenciadas em VPC, as células não aderentes são ainda diferenciadas em progenitoras de NK.

2.1. Geração do produto progenitoras de células Assassinas Naturais

A quantidade designada do produto da cultura de células inicial é suplementada no dia 3 após a iniciação da cultura com meio **Glycostem-Technology-Nk-day3** (GTNKd3) (1 mL de meio GTNKd3 por 1×10^6 de células totais de entrada). No dia 6 a cultura em suspensão é suplementada com meio **Glycostem-Technology-Nk-day6** (GTNKd6) (2 mL de meio GTNKd6 por 1×10^6 de células totais de entrada). A partir do dia 9 após a iniciação da cultura a suplementação do meio ocorre do seguinte modo:

Dia 9: adição de 4 mL de meio GTNKd6 por 1×10^6 células totais de entrada

Dia 12: adição de 8 mL de meio GTNKd6 por 1×10^6 células totais de entrada

Dia 15: adição de 16 mL de meio GTNKd6 por 1×10^6 células totais de entrada

No dia 18-21 todas as células são colhidas e 2 passos de lavagem em PBS contendo soro AB humano a 1% são realizados de acordo com procedimentos operacionais padrão conhecidos do perito no campo. Em seguida as células são novamente suspensas em solução fisiológica de NaCl (0,9%) para infusão no paciente. Após a infusão, as progenitoras de NK-IC, especificamente geradas para maturar dentro do corpo do paciente (*in vivo*) e finalmente se diferenciarem *in vivo* em células Assassinas Naturais funcionais, são capazes de matar alvos específicos de células tumorais. Por esta razão, o paciente é tratado, de preferência, imediatamente após infusão com IL-2 subcutânea (Proleukin®) a uma dose de 2×10^6 IU/kg de peso corporal. Uma pequena alíquota (total de 200 células) é utilizada para controlo de garantia de qualidade do produto para enumerar o número de progenitoras de células NK no produto final utilizando o ensaio NK-IC bem estabelecido, tal como descrito na literatura (Miller *et al.* 1999; Punzel *et al.*, 1999).

Exemplo experimental: Em 3 amostras independentes de SCU (quantidade entre 26-59 mL; TNC [células nucleadas totais] variando de $2-6 \times 10^8$) podiam ser geradas progenitoras de NK-IC com uma contagem total de células entre $1,1-1,9 \times 10^8$. Uma vez que 1 única NK-IC gera >1000 células NK maduras *in vivo*, um mínimo de 10 embalagens cada uma com a capacidade de gerar 1×10^8 /kg de peso corporal de células NK maduras

podem ser criopreservadas até à sua utilização de acordo com procedimentos operacionais padrão conhecidos dos peritos no campo.

Meios:

Meio GTNKd3

O meio consiste em DMEM/Meio 12 de Ham (Invitrogen Inc.) razão de volumes 2:1 (V/V) com soro AB humano a 8% (Cambrex Inc.), O-acetil-L-carnitina (OALC, Sigma Chemicals) ou derivados numa concentração final de 5 mmol/L, heparina N-dessulfatada-N-acetilada (Seigagaku Amerika Inc.) numa concentração de 60 mg/L, as seguintes citocinas humanas recombinantes (se não for mencionado especificamente, todas as citocinas foram proporcionadas por Stem Cell Technology Inc. ou R&D Systems): trombopoetina (TPO; 25 ng/mL); Ligando flt-3 (FLT-3L; 25 ng/mL), factor de células estaminais (SCF; 25 ng/mL), interleucina-7 (IL-7; 25 ng/mL), factor de crescimento endotelial vascular (VEGF; 10 ng/mL), interleucina-2 (Proleukin® [Chiron]; 750 U/mL), factor estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF, 10 pg/mL; Immunex Corp., Seattle, WA), factor estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF, 250 pg/mL; Amgen, Thousand Oaks, CA), factor inibidor de leucemia (LIF; 50 pg/mL), proteína inflamatória de macrófagos-1alfa (200 pg/mL; MIP-I alfa) e interleucina-6 (IL-6; 50 pg/mL). Suplementos adicionais são L-glutamina (2 mmol/L; Invitrogen), penicilina (1000 U/mL), estreptomina 100 U/mL (Invitrogen), 2-mercaptoetanol-beta 25 µM (Invitrogen), ácido ascórbico (20 mg/mL, Sigma), selenito de selénio (50 µmol, Sigma), etanolamina (50 µmol Sigma).

Meio GTNKd6

O meio consiste em DMEM/Meio 12 de Ham (Invitrogen Inc.) razão de volumes 2:1 (V/V) com soro AB humano a 8% (Cambrex Inc.), O-acetil-L-carnitina (OALC, Sigma Chemicals) ou derivados numa concentração final de 5 mmol/L, heparina N-dessulfatada-N-acetilada (Seigagaku Amerika Inc.) numa concentração de 60 mg/L, as seguintes citocinas humanas recombinantes (se não for mencionado especificamente, todas as citocinas foram proporcionadas por Stem Cell Technology Inc. ou R&D Systems): trombopoetina (TPO; 25 ng/mL); Ligando flt-3 (FLT-3L; 25 ng/mL), factor de células estaminais (SCF; 25 ng/mL), interleucina-7 (IL-7; 25 ng/mL), interleucina-15 (IL-15; 25 ng/mL), interleucina-2 (Proleukin® [Chiron]; 1500 U/mL), factor estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF, 10 pg/mL; Immunex Corp., Seattle, WA), factor estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF, 250 pg/mL; Amgen, Thousand Oaks, CA), factor inibidor de leucemia (LIF; 50 pg/mL), proteína inflamatória de macrófagos-1alfa (200 pg/mL; MIP-I alfa) e interleucina-6 (IL-6; 50 pg/mL). Suplementos adicionais são L-glutamina (2 mmol/L; Invitrogen), penicilina (1000 U/mL), estreptomicina 100 U/mL (Invitrogen), 2-mercaptoetanol-beta 25 µM (Invitrogen), ácido ascórbico (20 mg/mL, Sigma), selenito de selénio (50 µmol, Sigma), etanolamina (50 µmol Sigma).

Ensaio NK-IC para controlo de qualidade: Este ensaio enumera o número de progenitoras de células NK primitivas que tenham sido geradas no dia 18 da cultura. Cada única progenitora de NK-IC pode dar origem a >1000 células NK maduras e funcionais. Assim, este ensaio proporciona uma leitura valiosa e um instrumento de controlo de qualidade

para o produto. A pequena alíquota de células expandidas (200 células) será plaqueada em placas de 96 poços em ensaios de diluição limitante em co-culturas de AFT024 suplementadas com meio que consiste em DMEM/Meio 12 de Ham 2:1 (V/V) com soro AB humano a 20% inativado com calor e ácido ascórbico a 20 mg/mL, 50 µmol de selenito de selênio, 25 µmol de β-mercaptoetanol, 50 µmol de etanolamina, IL-2 a 1000 U/mL, IL-3 a 5 ng/mL [apenas inicialmente], Flt-3L a 10 ng/mL, SCF a 10 ng/mL e IL-7 a 20 ng/mL. Após 5-7 semanas de cultura as células foram analisadas fenotipicamente para células NK maduras e funcionais (CD56+/CD3-/CD16/NKp30/NKp44/NKp46, NKG2A/CD94, CD107).

2.2. Geração de produtos de células progenitoras vasculares

A quantidade designada do produto da cultura celular inicial tem de ser colocada em balões de cultura de tecidos de 175 cm² tratados revestidos com fibronectina no dia 3 após a iniciação e necessita de ser suplementada ainda com meio ***Glycostem-Technology-Vascular-Progenitor day 3-medium*** (GTVPd3) (15 mL de meio GTVPd3 por balão de 175 cm²). No dia 6 todas as células não aderentes têm de ser removidas e a suplementação do meio tem de ocorrer a partir do dia 6 da seguinte forma:

Dia 6: muda de 15 mL meio GTVPd6 por balão
Dia 12: muda de 15 mL meio GTVPd6 por balão
Dia 18: muda de 15 mL meio GTVPd6 por balão
Dia 24: muda de 15 mL meio GTVPd6 por balão

No dia 18-28 todas as células são colhidas utilizando uma solução de dissociação de células (Becton-Dickinson) e 2 passos de lavagem em PBS contendo soro AB humano a 1% são realizados de acordo com procedimentos operacionais padrão

conhecidos dos peritos no campo. Em seguida as células são ressuspensas em solução fisiológica de NaCl (0,9%) através de infusão no paciente.

Uma pequena alíquota (total de 1000 células) é usada para controlo de garantia de qualidade do produto para enumerar o número de progenitoras de células VP no produto final, utilizando métodos de detecção de células Progenitoras Vasculares bem estabelecidos que são bem conhecidos dos peritos no campo. A verificação fenotípica de células progenitoras endoteliais tem de incluir tomada de CD31, vWF, e Dil, tal como é bem conhecido do perito no campo. Várias publicações para a detecção de células VP foram publicadas na literatura (Gehling et al., 2000; Loges et al., 2004).

Exemplo experimental: Em amostras de 1 SCU (quantidade de 39 mL; TNC $2,2 \times 10^8$; CD34+ $0,9 \times 10^6$), colónias de células VP tal como definidas são geradas com uma contagem de células total após colheita entre $1,1-1,9 \times 10^6$ células. Estas células são criopreservadas até à sua utilização de acordo com procedimentos operacionais padrão conhecidos do perito no campo.

Meios:

Meio GTVPd3

O meio consiste em meio basal M199 suplementado com soro AB humano a 10% (Cambrex Inc.), O-acetil-L-carnitina (OALC, Sigma Chemicals) ou derivados numa concentração final de 5 mmol/L, as seguintes citocinas recombinantes humanas (se não for mencionado especificamente, todas as citocinas

foram proporcionadas por Stem Cell Technology Inc. ou R&D Systems): factor de crescimento de células estaminais (50 ng, SCGF) factor de crescimento endotelial vascular (VEGF; 50 ng/mL), angiopoetina-1 (100 ng, R&D-systems), angiopoetina-2 (100 ng, R&D-systems), factor de crescimento de fibroblastos básico (bFGF; 10 ng/mL), factor de crescimento semelhante a insulina (IGF; 10 ng/mL), trombopoetina (TPO; 25 ng/mL); Ligando flt-3 (FLT-3L; 25 ng/mL), interleucina-1 β (IL-1, 20 ng/mL), factor estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF; 10 pg/mL Immunex Corp., Seattle, WA), factor estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF, 250 pg/mL; Amgen, Thousand Oaks, CA), Factor inibidor de leucemia (LIF; 50 pg/mL), Proteína inflamatória de macrófagos-1alfa (200 pg/mL; MIP-I alfa) e interleucina-6 (IL-6; 50 pg/mL). Suplementos adicionais são L-glutamina (2 mmol/L; Invitrogen), penicilina (1000 U/mL), estreptomicina (100 U/mL, Invitrogen), 2-mercaptoetanol-beta 25 μ M (Invitrogen), ácido ascórbico (20 mg/mL, Sigma).

Meio GTVPd6

O meio consiste em meio basal M199 suplementado com soro AB humano a 2% (Cambrex Inc.), O-acetil-L-carnitina (OALC, Sigma Chemicals) ou derivados numa concentração final de 5 mmol/L, as seguintes citocinas recombinantes humanas (se não for mencionado especificamente, todas as citocinas foram proporcionadas por Stem Cell Technology Inc. ou R&D Systems): factor de crescimento de células estaminais (50 ng, SCGF) factor de crescimento endotelial vascular (VEGF; 50 ng/mL), factor de crescimento de fibroblastos básico (bFGF; 10 ng/mL), factor de crescimento semelhante à insulina (IGF, 10 ng/mL), trombopoetina (TPO; 25 ng/mL);

Ligando de flt-3 (FLT-3L, 25 ng/mL), interleucina-1 β (IL-1, 20 ng/mL). Suplementos adicionais são L-glutamina (2 mmol/L; Invitrogen), penicilina (1000 U/mL), estreptomicina (100 U/mL, Invitrogen), 2-mercaptoetanol-beta 25 μ M (Invitrogen), ácido ascórbico (20 mg/mL, Sigma).

Referências

Gehling, U. M., Ergun, S., Schumacher, U., Wagener, C., Pantel, K., Otte, M., Schuch, G., Schafhausen, P., Mende, T., Kilic, N., et al. (2000). "In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells". *Blood* 95: 3106-3112.

Loges, S., Fehse, B., Brockmann, M. A., Lamszus, K., Butzal, M., Guckenbiehl, M., Schuch, G., Ergun, S., Fischer, U., Zander, A. R., et al. (2004). "Identification of the adult human hemangioblast". *Stem Cells Dev.* 13: 229-242.

Miller, J. S., McCullar, V., Punzel, M., Lemischka, I. R., e Moore, K. A. (1999). "Single adult human CD34(+)/Lin-/CD38(-) progenitors give rise to natural killer cells, B-lineage cells, dendritic cells, and myeloid cells". *Blood* 93: 96-106.

Punzel, M., Wissink, S. D., Miller, J. S., Moore, K. A., Lemischka, I. R., e Verfaillie, C. M. (1999). "The myeloidlymphoid initiating cell (ML-IC) assay assesses the fate of multipotent human progenitors in vitro". *Blood* 93, 3750-3756.

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Meio para cultura, expansão e/ou diferenciação de células estaminais, o referido meio compreendendo um meio de cultura celular básico, soro humano a 1-20%, O-acetil-L-carnitina a 2-10 mmol/L, heparina N-dessulfatada-N-acetilada a 40-80 mg/L e uma combinação de citocinas adequadas, de preferência englobando três ou mais de trombopoetina, ligando flt-3, factor de células estaminais, G-CSF, GM-CSF, IL-6, MIP-I- α , e LIF.
2. Meio de acordo com a reivindicação 1, o qual compreende cerca de 3-8, de maior preferência cerca de 5 mmol/L de O-acetil-L-carnitina.
3. Meio de acordo com a reivindicação 1 ou 2, o qual compreende cerca de 50-70, de maior preferência cerca de 60 mg/L de heparina N-dessulfatada-N-acetilada.
4. Meio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3 para expansão de células estaminais, o referido meio compreendendo um meio para expansão de células estaminais compreendendo um meio de cultura celular básico, soro humano a 10-20%, O-acetil-L-carnitina a 2-10 mmol/L, heparina N-dessulfatada-N-acetilada a 40-80 mg/L e uma combinação de citocinas adequadas, de preferência englobando três ou mais de trombopoetina, ligando de flt-3, factor de células estaminais, G-CSF, GM-CSF, IL-6, MIP-I- α , e LIF.

5. Meio para expansão de acordo com a reivindicação 4, compreendendo cerca de 15% de soro humano, de preferência soro AB.
6. Meio para expansão de acordo com a reivindicação 4 ou 5, compreendendo cerca de 0-acetil-L-carnitina a 5 mmol/L.
7. Meio para expansão de acordo com qualquer uma das reivindicações 4-6, compreendendo heparina N-dessulfatada-N-acetilada a 60 mg/L.
8. Meio de acordo com qualquer uma das reivindicações 4-7, em que o meio básico é RPMI1640.
9. Meio para expansão de acordo com qualquer uma das reivindicações 4-8, que compreende trombopoetina, ligando flt-3, factor de células estaminais, G-CSF, GM-CSF, IL-6, MIP-I- α , LIF, VEGF, bFGF, IL-3 e IL-7.
10. Meio de acordo com a reivindicação 1-3 para diferenciação de células estaminais em progenitoras de células Assassinas Naturais, compreendendo entre 5-10% de soro humano.
11. Meio de acordo com a reivindicação 10 em que a quantidade de soro é de cerca de 8%.
12. Meio para diferenciação de acordo com a reivindicação 10 ou 11 que compreende cerca de 5 mmol/L de 0-acetil-L-carnitina.

13. Meio para diferenciação de acordo com qualquer uma das reivindicações 10-12, que compreende heparina N-dessulfatada-N-acetilada a 60 mg/L.
14. Meio de acordo com qualquer uma das reivindicações 10-13, em que o meio básico é uma mistura de 2:1 (v/v) de DMEM e HAM-F12.
15. Meio de diferenciação inicial de acordo com qualquer uma das reivindicações 10-14, em que a combinação de citocinas é TPO, FLT-3L, SCF, IL-7, VEGF, IL-2, GM-CSF, G-CSF, LIF, MIP-I- α e IL-6.
16. Meio de diferenciação secundário de acordo com qualquer uma das reivindicações 10-14, em que a combinação de citocinas é TPO, FLT-3, SCF, IL-7, IL-15, IL-2, GM-CSF, G-CSF, LIF, IL-6, MIP-I- α .
17. Estojo de componentes para a expansão e diferenciação de células estaminais em células progenitoras de NK, compreendendo um meio de expansão de acordo com qualquer uma das reivindicações 4-9, e um meio de diferenciação de acordo com qualquer uma das reivindicações 10-14.
18. Estojo de componentes para a expansão e diferenciação de células estaminais em células progenitoras de NK, compreendendo um meio de expansão de acordo com qualquer uma das reivindicações 4-9, um meio de diferenciação inicial de acordo com a reivindicação 15 e um meio de diferenciação secundário de acordo com a reivindicação 16.

19. Método para expansão e diferenciação de células estaminais em células progenitoras de NK, compreendendo a expansão de células estaminais num meio de acordo com qualquer uma das reivindicações 4-9, diferenciação das células expandidas num meio de diferenciação de acordo com qualquer uma das reivindicações 10-14.
20. Método para expansão e diferenciação de células estaminais em células progenitoras de NK, compreendendo a expansão de células estaminais num meio de acordo com qualquer uma das reivindicações 4-9, diferenciação das células expandidas num meio de diferenciação inicial de acordo com a reivindicação 15 e mais diferenciação das células resultantes num meio de diferenciação secundário de acordo com a reivindicação 16.
21. Método para expansão de células estaminais compreendendo a cultura das referidas células estaminais num meio de acordo com qualquer uma das reivindicações 4-9.
22. Método para diferenciação de células estaminais compreendendo cultura de células estaminais, de preferência células estaminais expandidas, em células progenitoras de NK num meio de diferenciação de acordo com qualquer uma das reivindicações 10-14.
23. Método para diferenciação de células estaminais compreendendo cultura de células estaminais, de preferência células estaminais expandidas, em células progenitoras de NK num meio de diferenciação inicial

de acordo com a reivindicação 15 e mais diferenciação das células resultantes num meio de diferenciação secundário de acordo com a reivindicação 16.

24. Meio de acordo com as reivindicações 1-3, para diferenciação de células estaminais em células progenitoras vasculares, compreendendo 7-12%, de preferência cerca de 10% de soro humano (de preferência AB).
25. Meio de diferenciação de acordo com a reivindicação 24, em que o meio básico é meio basal M199.
26. Meio de diferenciação inicial de acordo com a reivindicação 24 ou 25, em que a combinação de citocinas é SCGF, VEGF, angiopoetina-1, angiopoetina-2, bFGF, IGF, TPO, FLT-3L, II-1 β , GM-CSF, G-CSF, LIF, MIP-I- α e II-6.
27. Meio de diferenciação secundário de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, em que a combinação de citocinas compreende SCGF, VEGF, bFGF, IGF, TPO, FLT-3L e IL-1 β e a quantidade de soro humano é de 1-4%, de preferência cerca de 2%.
28. Método para expansão e diferenciação de células estaminais em células progenitoras vasculares, compreendendo a expansão de células estaminais num meio de acordo com qualquer uma das reivindicações 4-9, diferenciação das células expandidas num meio de diferenciação de acordo com a reivindicação 24 ou 25.

29. Método para expansão e diferenciação de células estaminais em células progenitoras vasculares, compreendendo a expansão de células estaminais num meio de acordo com qualquer uma das reivindicações 4-9, diferenciação das células expandidas num meio de diferenciação inicial de acordo com a reivindicação 26 e mais diferenciação das células resultantes num meio de diferenciação secundário de acordo com a reivindicação 27.
30. Método para diferenciação de células estaminais compreendendo a cultura de células estaminais, de preferência células estaminais expandidas, em células progenitoras vasculares num meio de diferenciação de acordo com qualquer uma das reivindicações 24-25.
31. Método para diferenciação de células estaminais compreendendo a cultura de células estaminais, de preferência células estaminais expandidas, em células progenitoras vasculares num meio de diferenciação inicial de acordo com a reivindicação 26 e mais diferenciação das células resultantes num meio de diferenciação secundário de acordo com a reivindicação 27.
32. Estojo de componentes para expansão e diferenciação de células estaminais em células progenitoras vasculares, compreendendo um meio de expansão de acordo com qualquer uma das reivindicações 4-9, e um meio de diferenciação de acordo com qualquer uma das reivindicações 24-25.

33. Estojo de componentes para a expansão e diferenciação de células estaminais em células progenitoras vasculares, compreendendo um meio de expansão de acordo com qualquer uma das reivindicações 4-9, um meio de diferenciação inicial de acordo com a reivindicação 26 e um meio de diferenciação secundário de acordo com a reivindicação 27.

Lisboa,

RESUMO

"MÉTODOS E MEIOS PARA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS E SUBSEQUENTE GERAÇÃO E EXPANSÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS, BEM COMO PRODUÇÃO DE CÉLULAS EFECTORAS COMO PRODUTOS TERAPÊUTICOS CLÍNICOS"

A invenção proporciona meios e métodos para proliferação de células estaminais e subsequente geração e expansão de células progenitoras. A invenção proporciona em particular meios e outras condições de cultura para as mesmas. As células são de preferência utilizadas como células efectoras como produtos terapêuticos clínicos.