

(11) Número de Publicação: **PT 106225 B**

(51) Classificação Internacional:
C12N 5/074 (2010.01) **C12N 5/0789** (2010.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2012.03.23**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2013.09.23**

(45) Data e BPI da concessão: **2017.10.31**
215/2017

(73) Titular(es):

**INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO
ÁREA DE TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA,
AVENIDA ROVISCO PAIS, 1 1049-001 LISBOA PT**

(72) Inventor(es):

JOAQUIM MANUEL SAMPAIO CABRAL	PT
CLÁUDIA ALEXANDRA MARTINS LOBATO DA SILVA	PT
PEDRO MIGUEL ZACARIAS ANDRADE	PT
FRANCISCO FERREIRA DOS SANTOS	PT
MARIA DA GRAÇA NORTADAS DUARTE DE ALMEIDA- PORADA	US

(74) Mandatário:

(54) Epígrafe: **PROCESSO DE EXPANSÃO EX VIVO DE CÉLULAS ESTAMINAIS EM
BIORREACTOR**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM PROCESSO DE EXPANSÃO EX VIVO DE CÉLULAS ESTAMINAIS, EM BIORREACTOR, DE UM MODO PARTICULAR, DE CÉLULAS ESTAMINAIS/PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS EM CO-CULTURA COM CÉLULAS ESTAMINAIS DO MESÊNQUIMA IMOBILIZADAS EM MICROTRANSPORTADORES, PARA TRANSPLANTAÇÃO. O PROCESSO COMPREENDE OS PASSOS DE: A) FORMAÇÃO DE UMA SUSPENSÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS DO MESÊNQUIMA IMOBILIZADAS EM MICROTRANSPORTADORES; B) INOCULAÇÃO, NUM BIORREACTOR CONTENDO UM MEIO DE EXPANSÃO, DE CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS EM CO-CULTURA COM AS CÉLULAS ESTAMINAIS DO MESÊNQUIMA IMOBILIZADAS EM MICROTRANSPORTADORES; C) EXPANSÃO DAS CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS.

RESUMO

"PROCESSO DE EXPANSÃO EX VIVO DE CÉLULAS ESTAMINAIS EM BIORREACTOR"

A presente invenção refere-se a um processo de expansão ex vivo de células estaminais, em biorreactor, de um modo particular, de células estaminais/progenitoras hematopoiéticas em co-cultura com células estaminais do mesênquima imobilizadas em microtransportadores, para transplantação. O processo compreende os passos de: a) formação de uma suspensão de células estaminais do mesênquima imobilizadas em microtransportadores; b) inoculação, num biorreactor contendo um meio de expansão, de células hematopoiéticas em co-cultura com as células estaminais do mesênquima imobilizadas em microtransportadores; c) expansão das células hematopoiéticas. O processo da invenção é passível de ser implementado em Kit.

DESCRIÇÃO

“PROCESSO DE EXPANSÃO EX VIVO DE CÉLULAS ESTAMINAIS EM BIORREACTOR”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um processo de expansão *ex vivo* de células estaminais, em biorreactor, de um modo particular, de células estaminais/progenitoras hematopoiéticas em co-cultura com células estaminais do mesênquima imobilizadas em microtransportadores, para transplantação.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

As células estaminais são células capazes de se auto renovarem e/ou produzirem diferentes linhagens de células maduras *in vitro* e *in vivo*. Deste modo, a utilização de células estaminais e dos seus progenitores surge como uma estratégia promissora em aplicações clínicas, nomeadamente em terapia celular e genética, com vista ao tratamento de diversas doenças degenerativas e/ou como adjuvantes de imunoterapia para tratamento de formas agressivas de cancro.

Em particular, nos transplantes de medula óssea, as células estaminais hematopoiéticas constituem a única terapia celular baseada em células estaminais implementada em todo o mundo.

Desde o primeiro transplante de medula óssea, em 1968, a utilização de células estaminais hematopoiéticas tem aumentado exponencialmente, chegando a 13000 doações em 2008, com o objectivo de tratar doenças malignas como leucemias, linfomas, mielomas, tumores sólidos (cancro da mama, cancro testicular, etc.). A estratégia de tratamento de doenças malignas passa pela administração de altas doses de quimioterapia e/ou radioterapia, enquanto o transplante de medula óssea promove o restauro da função hematopoiética (*i. e.*, sangue e sistema imunitário).

No caso de doenças não-malignas, tais como anemia aplástica, talassémia, doença de Gaucher, etc., a medula óssea disfuncional do doente é destruída e substituída por uma medula óssea de um dador saudável.

Mais recentemente, iniciaram-se vários ensaios clínicos com vista à utilização de células estaminais hematopoiéticas para o tratamento de doenças não-hematopoiéticas, tais como, por exemplo, epidermólise bolhosa hereditária, encefalopatia isquémica neonatal, enfarte agudo do miocárdio, esclerose lateral amiotrófica e acidente vascular cerebral, etc.

A célula hematopoiética mais primitiva expressa o抗原 de superfície CD34, uma glicoproteína transmembranar, ligada à adesão de células estaminais e progenitoras na medula óssea. A expressão do抗原 CD34 tem sido utilizada como critério para o isolamento e identificação de células estaminais/progenitoras hematopoiéticas. As células primitivas são também identificadas com base na expressão da proteína Thy-1 (ou CD90), marcador relacionado com células T. A expressão simultânea de CD34 e CD90 em células hematopoiéticas (*i. e.*, células CD34⁺CD90⁺), resultou em níveis de enxerto eficientes e

sustentados. A co-expressão de CD34 e CD90 está directamente relacionada com o potencial de repopulação da medula.

De um modo geral, as fontes de células estaminais hematopoiéticas incluem a medula óssea, sangue periférico mobilizado, sangue do cordão umbilical e o fígado fetal. As células do sangue do cordão umbilical apresentam características únicas quando comparadas com as células da medula óssea e do sangue periférico, de um modo preferido, pelo facto de serem células imaturas, com telómeros mais longos e, consequentemente, com um potencial proliferativo superior, estando imediatamente disponíveis apóis colheita, sem risco para a mãe e/ou para o bebé. Por outro lado, estas células apresentam menor risco de contaminações por vírus, permitindo ainda uma maior disparidade de抗ígenio leucocitário humano (4/6 versus 6/6 para medula óssea e sangue periférico), aumentando o leque de possíveis dadores compatíveis.

Uma única unidade de sangue do cordão umbilical contém um número limitado de células para transplante (cerca de 5×10^8 células mononucleadas), sendo tipicamente 100 vezes inferior ao número obtido do sangue periférico e 10 vezes inferior ao obtido da medula óssea. Este facto constitui um factor limitante para aplicação terapêutica, devido à maioria dos doentes transplantados com células de sangue do cordão umbilical serem crianças com pesos compreendidos entre 20-30 Kg. Portanto, o desempenho funcional do enxerto hematopoiético dependerá fortemente da dose celular administrada.

A expansão *ex vivo* surge então como alternativa com o objectivo de aumentar o número de células do sangue do cordão umbilical disponível para transplante hematopoiético. Neste

sentido, a realização de alguns estudos clínicos envolvendo a utilização de células estaminais hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical expandidas *ex vivo* tem demonstrado resultados promissores.

De facto, as interacções entre as células de estroma com células estaminais hematopoiéticas são conhecidas e são consideradas cruciais na manutenção das características multipotenciais das células estaminais hematopoiéticas após cultura *ex vivo*. Efectivamente, têm sido utilizadas células de estroma, de um modo particular, células estaminais humanas do mesênquima da medula óssea, em co-cultura com células estaminais hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical, resultando numa melhoria da expansão de células estaminais hematopoiéticas, bem como numa superior preservação da qualidade do enxerto durante a cultura *ex vivo*.

Contudo, a utilização de estroma para suportar a expansão de células estaminais hematopoiéticas confere algumas limitações ao processo, especialmente tendo em conta a complexidade do sistema de cultura, que, necessariamente, terá de albergar os elementos do estroma (células aderentes a superfícies) e células estaminais hematopoiéticas (células em suspensão). Esta limitação é tanto maior quanto maior for a escala de produção pretendida de células estaminais hematopoiéticas.

Dado que as células estaminais hematopoiéticas se situam *in vivo* na medula óssea, que é um tecido essencialmente estático, com fluxos muito baixos, que permite um contacto estável e duradouro entre os vários tipos de células, moléculas e matrizes que a compõem, as condições de cultura consideradas

ideais seriam as que conseguiram imitar, de modo mais próximo, as condições hidrodinâmicas do ambiente da medula óssea.

As culturas de células estaminais, em particular, células estaminais hematopoiéticas, têm sido efectuadas em condições estáticas, tipicamente em frascos de cultura tradicionais (e. g. Placas de Petri ou frascos de cultura de tecidos) que são limitados em termos de produtividade celular, na sua natureza não-homogénea, sem monitorização dos parâmetros de cultura e com elevada manipulação requerida aquando dos procedimentos de alimentação e/ou recuperação das células em cultura.

O pedido internacional WO 2010/138873 refere-se a um processo para expansão de células estaminais hematopoiéticas compreendendo co-cultura das referidas células com células estaminais de mesênquima, na presença de factores de crescimento. As condições de expansão das células estaminais hematopoiéticas baseiam-se em sistemas estáticos, em que a expansão celular se proporciona em camadas.

Neste sentido, são altamente desejáveis sistemas alternativos que proporcionem maiores produtividades celulares, monitorização e controlo de parâmetros afectos à cultura, como por exemplo, valores de pH, temperatura, concentração de oxigénio dissolvido, entre outros, com possibilidade de aumento de escala.

Foram já testados diversos tipos de sistemas de biorreactores para expansão *ex vivo* de células estaminais hematopoiéticas: sistemas agitados mecanicamente (aumento de 7 vezes do número de células estaminais inicial após 28 dias em cultura), sistemas de garrafas-rolantes (aumento de 17 vezes do

número de unidades formadoras de colónias - CFU), câmaras de perfusão (aumento de 2,4 vezes do número de células totais, sem aumento de células progenitoras CD34⁺ após duas semanas de cultura). Embora não exaustivo, este conjunto de resultados traduz um potencial limitado de aplicação terapêutica não só pela suplementação do meio de cultura com produtos de origem animal (ex. soro fetal bovino) bem como devido ao baixo número de células obtido.

Kedong et al. (2010) "Simultaneous expansion and harvest of hematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells derived from umbilical cord cells" (J. Mat. Sci.: Materials in Medicine, vol. 21, no. 12, 5 6 October 2010) divulga uma co-cultura do sangue do cordão umbilical células hematopoiéticas (fração mononuclear - sem seleção realizada) com células estaminais do mesênquima (MSC) isoladas do tecido adiposo. As MSC foram previamente cultivadas e depois imobilizadas em esferas de alginato, um suporte que de alguma forma protege as células da tensão de corte imposta pela agitação mecânica, enquanto confere uma difusão limitada de nutrientes, citocinas e fatores de crescimento para o ambiente envolvente. Este sistema não permite o contacto direto de células do sangue do cordão umbilical com MSC. Os autores visavam simultaneamente expansão de MSC e HSC da mesma fração de sangue do cordão umbilical. De um modo relevante, o isolamento e expansão de MSC seriam realizados através da natureza de aderência dos microtransportadores revestidos por vidro, enquanto que as HSC beneficiariam das citocinas e fatores de crescimento produzidos pelas MSC imobilizadas com alginato. Foram testados 3 sistemas diferentes: um estático (em placas de 6 poços) e 2 dinâmicos (um mecanicamente agitado "spinner flask" e um recipiente de parede rotativo - RWV). Após 9 dias de cultura, os autores observaram

uma expansão limitada tanto nas células mononucleares como nas HSC (CD34 + CD45-CD105 +) no "spinner flask" (aproximadamente 5 e 4 vezes, respetivamente), quando comparado com a condição estática e o sistema RWV. Na sua opinião, esses resultados são explicados pelos efeitos prejudiciais da tensão de corte na fisiologia celular, produzida pelo agitador do "spinner flask". De facto, os autores apontam para a necessidade de um sistema de expansão que se assemelhe ao microambiente da medula óssea, do qual o sistema RWV seria uma boa alternativa.

Por outro lado, Jarosck et al. apresentaram um factor de expansão de 2,4 em células hematopoiéticas totais, no mesmo período de tempo, utilizando um processo automatizado de perfusão, embora não se tenha observado uma expansão significativa de células CD34⁺.

Silva et al. (2010), "Dynamic cell-cell interactions between cord blood haematopoietic progenitors and the cellular niche are essential for the expansion of CD34+, CD34+CD38- and early lymphoid CD7+ cells" (J. Tissue Eng and Regener. Med. Vol 4, nº 2, 1 March), Andrade et al. (2010), "Systematic delineation of optimal cytokine concentrations to expand hematopoietic stem/progenitor cells in co-culture with mesenchymal stem cells" (Molec. Biosyst. Vol. 6, nº 7) and Silva et al. (2005), "A human stromal-based serum-free culture system supports the ex vivo expansion/maintenance of bone marrow and cord blood hematopoietic stem/progenitor cell" (Exp. Hematol. Vol 33, nº 7, 1 July) descrevem a expansão de HSC em co-cultura com MCS em condições estáticas clássicas, i.e., usando frascos de cultura estáticos padrão. Em particular, Silva et al. (2010) revela que a natureza das interações MSC:HSC é principalmente devido ao contacto célula-célula em vez da via dos produtos

solúveis obtidos. Andrade et al. (2010) descreve o benefício de ter MSC como uma camada de alimentação para suportar a expansão do HSC.

Tendo em conta o indicado acima, é reconhecido que sistemas de culturas estáticas apresentam várias limitações, tais como, a natureza não homogénea (levando a gradientes de nutrientes e de metabólitos tóxicos que podem prejudicar as culturas celulares), a falta de monitorização e controlo de parâmetros de qualidade (como pH, temperatura, oxigénio, concentração, etc.) ou a incapacidade de fazer o aumento de escala para um grau comercial clínico de um produto de terapia celular.

O pedido internacional WO 2008/149129 divulga um processo de expansão *ex vivo* utilizando células progenitoras CD34⁺ de sangue de cordão umbilical, em que estas células são encapsuladas numa matriz de suporte e colocadas num biorreactor de modo a proporcionar a sua expansão. No entanto, verifica-se que no processo aqui divulgado, a expansão celular ocorre de modo confinado às pérolas que constituem a camada de suporte, limitando assim o crescimento celular.

De acordo com o exposto, existe a necessidade de desenvolver um processo de expansão *ex vivo* de células estaminais em sistemas de cultura dinâmicos, escaláveis e altamente monitorizados e controlados, que permita obter uma elevada produtividade celular sem restrições de crescimento celular, que permita ainda observar Boas Práticas de Fábrica (GMP) que possam ajustar-se aos parâmetros de qualidade exigidos pelas entidades reguladoras.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O processo de expansão *ex vivo* de células estaminais/progenitoras hematopoiéticas da presente invenção compreende:

a) formação de uma suspensão de células estaminais do mesênquima imobilizadas em microtransportadores,

sendo caracterizado por compreender ainda:

b) inoculação, num biorreactor contendo um meio de expansão, de células hematopoiéticas em co-cultura com as células estaminais do mesênquima imobilizadas em microtransportadores, e

c) expansão das células hematopoiéticas.

Num aspecto, o processo é caracterizado por as células estaminais do mesênquima serem células de medula óssea.

Num outro aspecto da invenção, o processo é caracterizado por as células hematopoiéticas serem células de sangue do cordão umbilical.

Ainda num outro aspecto, o processo da invenção é caracterizado por as referidas células de sangue do cordão umbilical serem enriquecidas para o抗ígeno CD34 antes do passo b) de inoculação.

De um modo preferido, a razão entre as células estaminais do mesênquima e células estaminais hematopoiéticas é de 2:1.

Também de um modo preferido, o passo c) de expansão realiza-se num intervalo de tempo de expansão de 4 a 14 dias, de um modo mais preferido entre 7 e 14 dias e de um modo muito preferido em 10 dias.

O processo da invenção é caracterizado por o passo c) de expansão compreender:

- ciclos alternados de 1 a 10 minutos de agitação entre 10 rpm e 100 rpm, seguida de 2 a 6 horas de repouso, durante o primeiro dia e,
- agitação constante entre 10 rpm e 100 rpm, nos dias seguintes.

Numa forma de realização muito preferida da presente invenção, o processo compreende ciclos de 5 minutos de agitação a 40 rpm, seguida de 4 horas de repouso, durante o primeiro dia; e agitação constante a 40 rpm, nos dias seguintes.

De um modo preferido, o meio de expansão das células hematopoiéticas é um meio sem soro e compreendendo citocinas.

Num aspecto preferido da invenção, as referidas citocinas são seleccionadas do grupo compreendendo factor de células estaminais (SCF), tirosina-cinase 3 semelhante a fms (Flt-3), trombopoietina (TPO) e factor de crescimento de fibroblasto (FGF) e semelhantes e suas combinações.

De um modo muito preferido, a concentração de oxigénio dissolvido no meio de expansão está compreendida entre 0,30 mg/L e 7,50 mg/L; o pH do meio de expansão está compreendido entre

7,0 e 7,5 e a temperatura do meio de expansão está compreendida entre 36 °C e 38 °C.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

De seguida procede-se à descrição detalhada da invenção fazendo referência aos desenhos anexos, nos quais:

A Fig. 1 representa graficamente a expansão, sob condições dinâmicas em frasco dotado de meios para agitação, de células hematopoiéticas totais e CD34⁺ do sangue do cordão umbilical em co-cultura com células estaminais do mesênquima, immobilizadas em microtransportadores (condição com Células Estaminais do Mesênquima - "com MSC"). Como controlo, cultivaram-se, em frasco dotado de meios para agitação, células hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical na ausência de células estaminais do mesênquima immobilizadas em microtransportadores (condição sem Células Estaminais do Mesênquima - "Sem MSC").

A Fig. 2 representa graficamente a expansão, sob condições dinâmicas em frasco dotado de meios para agitação, de células CD34⁺ do sangue do cordão umbilical em co-cultura com células estaminais do mesênquima, immobilizadas em microtransportadores (condição "Frasco dotado de meios para agitação") e em condições estáticas ("Estático+MSC"). Foi também realizado um controlo estático sem células estaminais do mesênquima immobilizadas em microtransportadores (condição "Estático sem MSC"). Os níveis de expansão ou proliferação representados pelo fator de expansão foram determinados durante o tempo de cultura nas três condições.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um processo de expansão *ex vivo* de células estaminais em biorreactor, de células estaminais/progenitoras hematopoiéticas em co-cultura com células estaminais do mesênquima imobilizadas em microtransportadores, para transplantação.

Surpreendentemente verificou-se que o processo da presente invenção proporciona valores de expansão de células hematopoiéticas superiores aos da técnica anterior em condições dinâmicas.

Este resultado é inesperado uma vez que o especialista poderia razoavelmente esperar que um tipo de cultura em biorreactor apresentasse inconvenientes resultantes de tensões de corte induzidas pela agitação, cujas tensões de corte são consideradas prejudiciais para a manutenção/viabilidade de células animais, em particular de células estaminais hematopoiéticas. Aliás, os fracos resultados obtidos por processos dinâmicos (em biorreactor) referidos anteriormente, eram atribuídos pelos especialistas na técnica a estas razões.

Salvo indicação em contrário, as gamas de valores apresentadas na presente descrição destinam-se a proporcionar um modo simplificado e tecnicamente aceite para indicar cada valor individual dentro da respectiva gama. A título de exemplo, a expressão "1 a 2" ou "entre 1 e 2" significa qualquer valor dentro deste intervalo, por exemplo 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 1,9; 2,0. Todos os valores mencionados na presente descrição devem ser interpretados como valores

aproximados, por exemplo a referência a "2,0" significa "cerca de 2,0".

Note-se que independentemente da apresentação explicita de uma expressão quantitativa "cerca de X", qualquer valor X apresentado no decurso da presente descrição deve ser interpretado como um valor aproximado do valor X real, uma vez que tal aproximação ao valor real seria razoavelmente esperada pelo especialista na técnica devido a condições experimentais e/ou de medição que introduzem desvios ao valor real.

Como aqui utilizados, os termos "células estaminais do mesênquima", "células de estroma" e "células de suporte" descrevem células estaminais multipotentes, originárias de vários tecidos humanos, que são abrangidos por critérios estabelecidos em 2006 pela Sociedade Internacional de Terapia Celular:

- 1) as células aderentes em frascos de cultura celular estão em condições de cultura tradicionais;
- 2) mais de 95% da população celular deve expressar os marcadores CD73, CD90 e CD105, medidos por citometria de fluxo e não expressar, ou expressar menos de 2%, os marcadores CD11b ou CD14, CD34, CD45, CD79a ou CD19 e ALH classe II;
- 3) as células devem diferenciar-se em osteoblastos, adipócitos e condroblastos, em condições de cultura *in vitro* adequadas.

O processo de expansão celular da presente invenção inicia-se com a formação de uma camada de suporte a partir de

isolamento de células estaminais do mesênquima. Estas células podem ser isoladas a partir de vários tecidos adultos, tais como, medula óssea, sangue do cordão umbilical, matriz do cordão umbilical, tecido adiposo, fluido amniótico ou urina.

Numa forma de realização da presente invenção, são utilizadas células estaminais do mesênquima isoladas da medula óssea. Estas células são expandidas em condições estáticas e, em seguida, adicionadas a um biorreactor onde se encontram os microtransportadores previamente preparados. Como consequência, forma-se uma suspensão celular imobilizada em microtransportadores à qual se adiciona, posteriormente, um composto que inactiva o crescimento das células estaminais do mesênquima.

Por "células estaminais hematopoiéticas", "células indiferenciadas" e "células primitivas" entendem-se células estaminais hematopoiéticas com capacidade de proliferação *in vivo* e de repopulação da medula óssea de um mamífero imunocomprometido (*i. e.*, um indivíduo que possui um sistema imunitário deficiente ou ausente quando transplantado).

Sabe-se que a célula hematopoiética mais primitiva expressa o抗原 de superfície CD34, que é uma glicoproteína transmembranar, ligada à adesão de células estaminais e progenitoras na medula óssea. A expressão do抗原 CD34 tem sido utilizada como critério para o isolamento e identificação de célula estaminal/progenitora hematopoiética. As células primitivas são também identificadas com base na expressão da proteína Thy-1 (ou CD90), marcador relacionado com células T. A expressão simultânea de CD34 e CD90 em células hematopoiéticas (*i. e.*, células CD34⁺CD90⁺), resultou em eficientes e sustentados

níveis de enxerto. A co-expressão de CD34 e CD90 está directamente relacionada com o potencial de repopulação da medula óssea do mamífero transplantado.

Os termos "células hematopoiéticas totais" e "células totais" referem-se a todas as células hematopoiéticas (estaminais e não estaminais, *i. e.* primitivas e maduras) em cultura. De um modo particular, as células maduras (também designadas como células diferenciadas) podem compreender células CD3⁺, CD19⁺, CD14⁺, CD15⁺, CD33⁺, CD11c+HLA-DR⁺, CD56⁺, CD235a⁺, CD41⁺, CD38⁺, CD45RA⁺ e CD127.

Na presente invenção, a cultura de células estaminais hematopoiéticas e de células estaminais do mesênquima é designada por co-cultura, uma vez que se refere à cultura de dois tipos de células diferentes no mesmo biorreactor.

Na presente descrição, o termo "biorreactor" significa um vaso reaccional dotado de meios de controlo e agitação adequados à ocorrência de reacções biológicas em condições dinâmicas. Consideram-se condições dinâmicas todas as que não são exclusivamente estáticas incluindo, por exemplo, a alternância de ciclos de agitação com estados de repouso.

A quantidade relativa de células estaminais hematopoiéticas e de células estaminais do mesênquima no início da co-cultura designa-se por razão de células estaminais do mesênquima e células estaminais hematopoiéticas. Os dois tipos de células estaminais em co-cultura podem pertencer ao mesmo dador ou a dadores diferentes.

Por "expansão celular" ou "proliferação celular" entende-se o aumento de população de células (e. g., células estaminais hematopoiéticas) face ao número inicial de células em cultura, como resultado da manutenção das condições de cultura adequadas para promover a divisão celular. De modo a quantificar esta expansão, utilizou-se um "factor de expansão" que consiste no resultado do quociente do número de células num determinado dia, pelo número de células no início da cultura celular. Por exemplo, um factor de expansão de 10 em células CD34⁺ significa que a população original aumentou dez vezes o número original de células.

Numa forma de realização da invenção, as células estaminais hematopoiéticas são células retiradas de sangue de cordão umbilical, enriquecidas para o antígeno CD34 antes de serem colocadas em co-cultura, num biorreactor, com as células estaminais de mesênquima da camada de suporte.

O especialista na técnica poderá selecionar qualquer biorreactor dentro do âmbito definido na presente invenção. Poderão ser considerados biorreactores com diferentes configurações, sendo que no contexto de cultura de células animais podem ser utilizados, a título exemplificativo e não limitativo, reactor do tipo tanque agitado, reactor de leito fixo, reactor de leito fluidizado e reactor basculante. Os reactores do tipo tanque agitado actuam por acção mecânica de uma turbina ou pá, conferindo um ambiente homogéneo à cultura celular. Por outro lado, os reactores de leito fixo e fluidizado compreendem a presença de um enchimento (ou leito) normalmente composto por materiais inertes (e. g., suportes sintéticos, polímeros) de elevada área por unidade de volume e que promovem adesão celular (e. g., poliestireno, policaprolactona,

poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) etc.), permitindo caudais de operação mais baixos e, como consequência, menores forças de tensão de corte, diminuindo assim o impacto deletério na viabilidade celular. Do mesmo modo, o biorreactor do tipo basculante confere condições dinâmicas semelhantes através da oscilação de um saco biocompatível, comercialmente disponível de GE Healthcare, contendo os vários componentes da co-cultura. De um modo preferido, o reactor a utilizar na presente invenção é um reactor do tipo tanque agitado do tipo frasco dotado de meios para agitação.

A presente invenção comprehende ainda um passo de inoculação. No inicio deste passo a densidade celular de células estaminais hematopoiéticas é de 5×10^4 células/mL. Estas células são assim introduzidas num biorreactor em conjunto com as células da camada de suporte.

Numa forma de realização a razão entre as células estaminais do mesênquima e células estaminais hematopoiéticas é de 2:1.

Como deverá ser entendido pelo especialista na técnica, de modo a garantir condições de cultura optimizadas para expansão celular *ex vivo* de células estaminais, o presente processo da invenção comprehende ainda estímulos físicos e químicos.

Os estímulos físicos a monitorizar e controlar são: a concentração de oxigénio dissolvido, que deve situar-se entre 0,30 mg/L e 7,50 mg/L, de um modo preferido entre 0,33 mg/L e 7,1 mg/L; o pH do meio de cultura, que deverá estar compreendido entre 6,5 e 8; de um modo preferido entre 7 e 7,5; de um modo muito preferido entre 7,2 e 7,4; e a temperatura, que deverá ser

mantida entre 33 °C e 38 °C; de um modo preferido entre 36 °C e 38 °C; de um modo mais preferido entre 36,5 °C e 37,5 °C; de um modo muito preferido 37 °C.

Os estímulos químicos incluem a adição de factores de crescimento, ou citocinas, que constituem um conjunto de substâncias de natureza proteica que ocorrem naturalmente no organismo vivo e que são necessárias para a manutenção das culturas *ex vivo*. Os factores de crescimento, tais como, o factor de células estaminais (SCF), tirosina-cinase 3 semelhante a fms (Flt-3), trombopoietina (TPO), factor de crescimento de fibroblasto (FGF), interleucina 1, interleucina 2, interleucina 10, interleucina 6, angiopoetina, factor de inibição de leucemia são conhecidos, isolados ou em combinação, como promotores de proliferação *ex vivo* de células estaminais hematopoiéticas.

De um modo preferido, as citocinas a utilizar na presente invenção devem ser selecionadas do grupo consistindo em factor de células estaminais (SCF), tirosina-cinase 3 semelhante a fms (Flt-3), trombopoietina (TPO) e factor de crescimento de fibroblasto (FGF).

O meio de expansão celular a utilizar será, de um modo preferido, um meio sem soro (o que permite garantir a ausência de reacções imunológicas devido à não existência de proteínas de origem animal), enriquecido com citocinas, que proporciona a expansão de células estaminais hematopoiéticas em co-cultura com células estaminais do mesênquima isolada em microtransportadores.

A presente invenção comprehende também um passo de expansão, em que o referido biorreactor é submetido a um regime de

agitação, em ciclos alternados compreendendo, no primeiro dia de expansão, 1 a 10 minutos de agitação e 2 a 6 horas de repouso, de um modo preferido 2 a 8 minutos de agitação e 3 a 5 horas de repouso. Numa forma de realização muito preferida, o regime compreende, no primeiro dia de expansão, 5 minutos de agitação a 40 rpm e 4 horas de repouso. Nos restantes dias, a velocidade de agitação deverá manter-se constante, numa gama de 10 a 100 rpm, de um modo preferido 20 a 80 rpm, de um modo mais preferido 30 a 70 rpm. Numa forma de realização muito preferida, a velocidade de agitação é de 40 rpm.

No que se refere ao tempo de expansão, este deverá variar entre 4 e 14 dias, de um modo preferido entre 7 e 14 dias, de um modo muito preferido 10 dias.

Durante a expansão celular, o meio de expansão é substituído, por exemplo, aos dias 3, 7 e 10, de modo a permitir a expansão contínua das células, sem saturação do meio.

De acordo com o processo da presente invenção, no fim do passo de expansão celular, o interior do biorreactor contém meio líquido com células hematopoiéticas totais, células estaminais/progenitoras hematopoiéticas assim como suportes inertes contendo células estaminais do mesênquima aderidas à superfície.

Em seguida, com base na diferença de diâmetro entre as células hematopoiéticas (2-10 μm) e os suportes inertes (superior a 100 μm) é possível proceder à separação destes dois componentes utilizando um filtro de diâmetro de poro superior a 10 μm e inferior a 100 μm .

De um modo surpreendente, numa forma de realização preferida, foram obtidos números clinicamente significativos de 19 milhões de células CD34⁺, resultantes do processo de expansão celular da invenção. Estes resultados superam as limitações verificadas no estado da técnica, uma vez que permitem obter um número de células suficiente para transplantação em adultos, por exemplo, para reconstituir de uma forma estável e duradoura o sistema sanguíneo, quando transplantadas num ser humano.

A presente invenção pode ser implementada na forma de um Kit constituído por um saco de cultura celular, com volumetria variável (por exemplo, pelo menos, dois compartimentos separados por selantes) contendo, num primeiro compartimento, células estaminais do mesênquima (MSC) imobilizadas em microtransportadores e que, após selecção/enriquecimento (feito no momento) das células do sangue do cordão umbilical para o抗ígenio de superfície CD34, estas são inoculadas no biorreactor juntamente com o meio de cultura suplementado com as citocinas (2º componente do Kit). Nesse momento, permite-se a intercomunicação entre os dois compartimentos e, por conseguinte, o estabelecimento da co-cultura.

Este saco de cultura celular, descartável e de utilização única, é colocado num biorreactor, por exemplo, do tipo basculante (velocidades de agitação entre 20-60 rpm - de um modo preferido 40 rpm), durante o tempo de cultura (4-14 dias, de um modo preferido 10 dias), sendo que, no final da cultura, faz-se passar a suspensão celular, por exemplo, por uma válvula de saída à qual se acoplou um filtro com diâmetro de poro superior a cerca de 10 micrómetros (tamanhos típicos de células estaminais hematopoiéticas HSC em cultura) e inferior a cerca de 100 micrómetros (diâmetro mínimo dos microtransportadores +

MSC), de modo a que as células de interesse possam ser recolhidas e administradas.

Este Kit apresenta a vantagem de poder ser armazenado/expedido congelado (por exemplo, a -196 °C em Azoto líquido ou em gelo seco, respectivamente), sendo o saco (contendo as células/microtransportadores) passível de ser descongelado em banho termostatizado à temperatura conveniente, por exemplo 37 °C, no momento desejado, para iniciar a co-cultura, poupando cerca de 15 dias de tempo total de obtenção da dose de HSC, resultante da eliminação do tempo de estabelecimento da camada de suporte de MSC.

Para uma melhor compreensão da invenção, descreve-se de seguida, a título ilustrativo e não limitativo, um exemplo de aplicação do processo da presente invenção.

EXEMPLO

Estabelecimento das camadas de estroma compostas por células estaminais do mesênquima isoladas da medula óssea em microtransportadores utilizando frascos dotados de meios para agitação.

Prepararam-se microtransportadores feitos de plástico, não porosos (SoloHill Engineering, Inc.), de acordo com as instruções do fabricante, revestidos com CELLstart™ (diluído 1:100 em PBS com Ca^{2+} e Mg^{2+}) durante 2 horas a 37 °C, com agitação intermitente (1 minuto a 300 rpm, 10 minutos desligado) utilizando um bloco agitador termostatizado.

As células estaminais do mesênquima humanas, previamente isoladas de um aspirado de medula óssea (após centrifugação com gradiente de Ficoll), foram expandidas em condições estáticas (frascos de cultura standard), utilizando meio sem soro, e adicionaram-se a 20 g/L de microtransportadores preparados anteriormente por meio de duas passagens. Em seguida, transferiram-se para um frasco dotado de meios para agitação (Bellco Glass, Inc.) com um volume útil de 80 mL, equipado com pás a 90° e um agitador magnético. Após o dia 3, retirou-se, diariamente, 25% do volume de meio e substituiu-se pela mesma quantidade de meio fresco até ao dia 10 de cultura. O número de células estaminais do mesênquima foi determinado numa amostra de 1 mL do frasco dotado de meios para agitação, utilizando o processo do Azul de Tripano, após digestão enzimática com Accutase (Sigma, 7 minutos a 37 °C), de modo a libertar as células dos microtransportadores de plástico. À suspensão das células imobilizadas em microtransportadores adicionou-se mitomicina C (Sigma) 0,5 ng/mL em meio Iscove Modified Dulbecco's Medium (IMDM) de modo a inactivar o crescimento das células estaminais do mesênquima.

Expansão ex vivo das células CD34⁺ enriquecidas em frasco dotado de meios para agitação

A fração mononucleada do sangue do cordão umbilical foi obtida após centrifugação com gradiente de Ficoll. Em seguida, procedeu-se ao enriquecimento das células de sangue do cordão umbilical para o抗ígeno CD34 utilizando partículas imunomagnéticas com o anticorpo anti-CD34 (MACS, Miltenyi) imobilizado (percentagem inicial 84±3% de células CD34⁺).

A população de células enriquecida para CD34 foi inoculada em frascos dotados de meios para agitação de 25 mL (Wheaton Science; volume útil=20 mL) a uma densidade celular de 5×10^4 células/mL em co-cultura com células estaminais do mesênquima imobilizadas em microtransportadores (razão de células estaminais do mesênquima: células estaminais hematopoiéticas de 2:1).

Durante as primeiras 24 horas utilizou-se um regime de agitação intermitente: 5 minutos de agitação a 40 rpm e 4 horas de repouso durante o primeiro dia de expansão, após o qual a agitação foi mantida a 40 rpm até ao dia 14.

Durante o tempo de expansão são monitorizados e controlados os seguintes parâmetros físicos: a tensão de oxigénio (ou percentagem de oxigénio), que deve situar-se entre 0,33 mg/L e 7,1 mg/L de oxigénio dissolvido e que pode ser ajustada através da injeção de azoto; o pH do meio de cultura, que deverá estar compreendido entre 7,2 e 7,4, e que pode ser ajustado por adição de uma solução de uma base, como por exemplo, o NaOH; e a temperatura, que deverá ser mantida entre 36,5 °C e 37,5 °C, através da circulação de um fluido na camisa do biorreactor.

Utilizou-se meio sem soro, QBSF-60 (Quality Biological Inc), suplementado com uma combinação de citocinas, sem componentes de origem animal, optimizada para expansão de células CD34⁺ de sangue do cordão umbilical, em co-cultura com células estaminais do mesênquima. As citocinas utilizadas foram SCF a 60 ng/mL, Flt-3 a 55 ng/mL, TPO a 50 ng/mL e bFGF a 5 ng/mL de Peprotech. A co-cultura foi alimentada aos dias 3, 7 e 10 da expansão, retirando metade do meio de cultura do frasco dotado de meios para agitação e substituindo a mesma quantidade

por meio de cultura fresco, garantindo que o volume se mantém constante ao longo do tempo em cultura (14 dias).

Foi ainda efectuado um controlo periódico na ausência de células estaminais do mesênquima imobilizadas em microtransportadores ("Sem MSC"), retirando uma amostra de 1 mL do frasco dotado de meios para agitação, filtrando-a (para separar as células hematopoiéticas dos microtransportadores com MSC imobilizadas) e, em seguida, procedeu-se à contagem do número de células totais. Foram ainda realizados estudos de citometria de fluxo para avaliar o número de células estaminais/progenitoras hematopoiéticas (CD34⁺).

A figura 1 mostra os níveis de expansão de células hematopoiéticas totais e de células CD34⁺ em frasco dotado de meios para agitação, na presença de células estaminais do mesênquima imobilizadas em microtransportadores (condição "Com MSC"), obtendo um total de $4,6 \times 10^7$ células totais e $1,49 \times 10^7$ células CD34⁺, correspondendo a um factor de expansão de 19.

O factor de expansão foi ainda determinado durante o tempo em cultura utilizando um controlo sem adição de MSC imobilizadas em microtransportadores (condição "Sem MSC"), em que a expansão de células totais e CD34⁺ não foi significativa (factor de expansão máximo de 1,7 após 7 dias em cultura).

De modo a avaliar a qualidade funcional das células obtidas, monitorizou-se o potencial de formação de colónias do tipo "pedra da calçada" (CAFC) *in vitro* das células frescas (*i. e.*, não cultivadas) e expandidas, ao dia 7 e 10 de cultura, em condições de agitação (condição "frasco dotado de meios para agitação") e estáticas ("Estático"), na presença de células estaminais do mesênquima imobilizadas em microtransportadores,

como se observa na Tabela 1 seguinte.

Tabela 1 - Potencial de formação de colónias do tipo "pedra da calçada" (CAFC). Os resultados estão apresentados como factor de expansão (relativamente ao dia 0 - células frescas) de CAFC em relação às condições agitadas (Frasco dotado de meios para agitação; n=4) e estáticas (Estático; n=1), ambas na presença de células estaminais do mesênquima imobilizadas em microtransportadores.

CAF	dia	Frasco dotado de meios para agitação	Estático
	0	1,0	1,0
	7	9,5 ± 0,70	5,5
	10	4,9 ± 0,28	0,71

Verificou-se que a cultura em frasco dotado de meios para agitação (em condições de agitação mecânica) promoveu um resultado de expansão similar à condição estática (factor de expansão de células CD34⁺ de 19 versus 23) e consideravelmente mais elevada do que a expansão na ausência de células estaminais do mesênquima, em condições estáticas (factor de expansão de células CD34⁺ de 12 ao dia 10), como se observa na Figura 2.

No entanto, embora os valores de expansão de células CD34⁺ obtidos para os sistemas dinâmicos sejam semelhantes aos dos sistemas estáticos, para uma densidade inicial de 5×10^4 células/mL, foi obtido um número clinicamente significativo de células CD34⁺ (19 milhões) para um transplante hematopoiético num doente adulto.

Estes resultados constituem um dos maiores desempenhos de expansão de células hematopoiéticas cultivadas em biorreactor dinâmico (quer em factor de expansão, quer em número de células produzido) encontrado na literatura, após 10 dias de expansão ($1,5 \times 10^7$ células CD34⁺ obtidas a partir de 1×10^6 células enriquecidas para CD34⁺).

Do ponto de vista funcional também os resultados são positivos, uma vez que o potencial de formação de CAFC obtido em condições dinâmicas proporcionou um factor de expansão significativamente superior ao obtido em condições estáticas, aos dias 7 e 10 de cultura.

Lisboa, 18 de agosto de 2017

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de expansão *ex vivo* de células estaminais/progenitoras hematopoiéticas caracterizado por compreender os seguintes passos:
 - a) formação de uma suspensão de células estaminais do mesênquima imobilizadas em microtransportadores;
 - b) co-cultura de células estaminais hematopoiéticas com as células estaminais do mesênquima em suportes inertes, na presença de fatores de crescimento em meio isento de soro, numa razão entre as células estaminais do mesênquima e células estaminais/progenitoras hematopoiéticas de 2:1;
 - c) expansão de células estaminais/progenitoras hematopoiéticas por aplicação alternada de ciclos de 1 a 10 minutos de agitação a 40 rpm, seguida de 2 a 6 horas de repouso, durante o primeiro dia de co-cultura;
 - d) manutenção da cultura celular sob condições dinâmicas durante, pelo menos, mais 3 dias com uma velocidade de agitação constante de 40 rpm.
2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender células estaminais do mesênquima isoladas de medula óssea ou de sangue do cordão umbilical, ou de matriz do cordão umbilical, ou de tecido adiposo, ou de fluido amniótico ou urina.
3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender células estaminais do mesênquima congeladas ou frescas imobilizadas em microtransportadores.

4. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender células estaminais/progenitoras hematopoiéticas isoladas de sangue do cordão umbilical, medula óssea, sangue periférico mobilizado e fígado fetal.
5. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender células estaminais do mesênquima humanas.
6. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender células estaminais do mesênquima e hematopoiéticas do mesmo dador.
7. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender a utilização de meio de cultura sem componentes de origem animal.
8. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela adição dos seguintes fatores de crescimento: células estaminais (SCF), tirosina-cinase 3 semelhante a fms (Flt-3), trombopoietina (TPO) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF), interleucina 1, interleucina 2, interleucina 10, interleucina 6, angiopoetina, fator de inibição de leucemia, isolados ou em combinação.
9. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar um reator do tipo tanque agitado, um reator de leito fixo, ou um reator de leito fluidizado, ou um reator basculante, ou outro sistema de cultura dinâmico para o cultivo de células animais.

10. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as células obtidas após a expansão expressam o antigénio de superfície CD34, CD90, ou uma sua combinação.
11. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela monitorização da concentração de oxigénio dissolvido no biorreator estar compreendida entre 0,33 mg/L e 7,1 mg/L.
12. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo pH do meio de cultura ser 7,2 e a temperatura de 37 °C.
13. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por após o período de co-cultura, o conteúdo do reator ser filtrado, sendo o filtrado enriquecido com células estaminais/progenitoras hematopoiéticas.
14. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as células estaminais/progenitoras hematopoiéticas expandidas produzem células maduras com expressão dos antigénios de superfície CD3+, CD19+, CD14+, CD15+, CD33+, CD11c+ HLA-DR+, CD56+, CD235a+, CD41+, CD38+, CD45RA+ e CD127+.

Lisboa, 19 de outubro de 2017

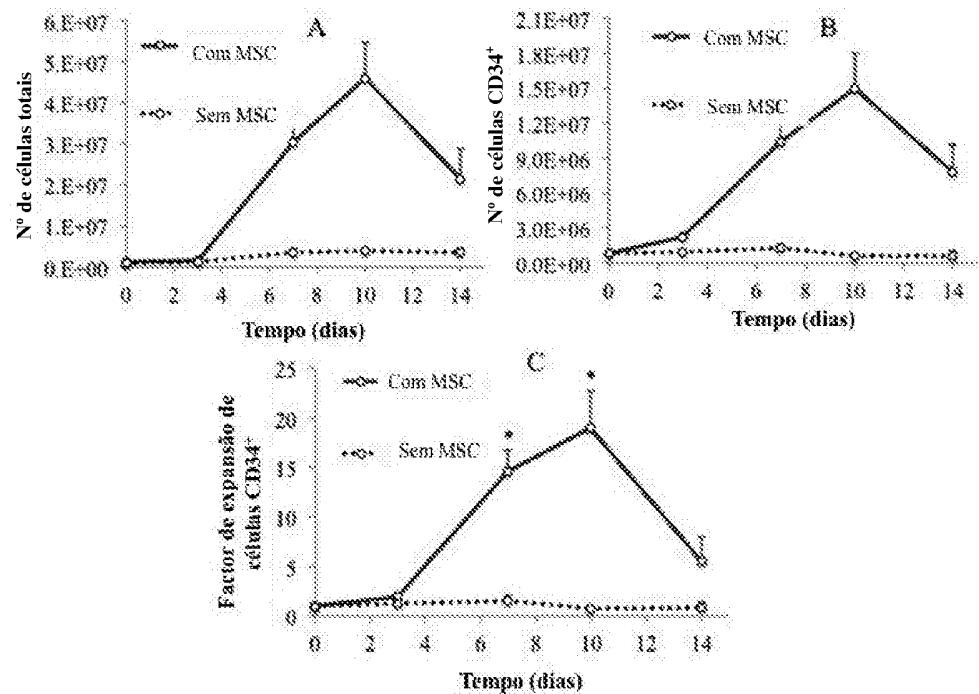


Figura 1

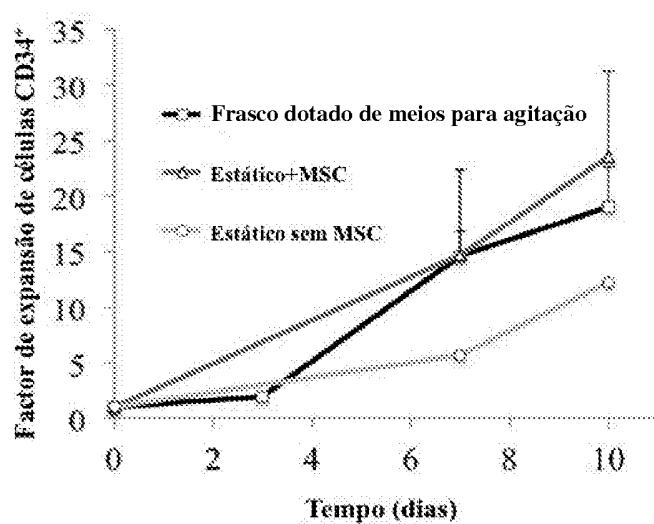


Figura 2