

(11) Número de Publicação: **PT 946199 E**

(51) Classificação Internacional:

**A61K 48/00** (2007.10) **C12N 5/00** (2007.10)

**C12P 21/06** (2007.10) **C12P 19/00** (2007.10)

**C12Q 1/02** (2007.10) **C12N 5/06** (2007.10)

**C07K 14/495** (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1997.11.12**

(30) Prioridade(s): **1996.11.12 US 747514**

(43) Data de publicação do pedido: **1999.10.06**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.06.04**  
**170/2008**

(73) Titular(es):

**UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA**  
**UNIVERSITY PARK CAMPUS LOS ANGELES,**  
**CA 90089** **US**

(72) Inventor(es):

**FREDERICK L. HALL** **US**  
**ERLINDA MARIA GORDON** **US**  
**W. FRENCH ANDERSON** **US**

(74) Mandatário:

**JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO**  
**R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA** **PT**

(54) Epígrafe: **CÉLULAS SENSÍVEIS A FTC&#914;1 DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA**

(57) Resumo:

## RESUMO

### CÉLULAS SENSÍVEIS A FTC $\beta$ 1 DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA

A presente invenção tem por objecto uma população homogénea de células sensíveis a FTC $\beta$  derivadas de medula óssea, um processo para a sua selecção a partir da medula óssea e um processo para a expressão de uma proteína recombinante a partir das células derivadas da medula óssea. A selecção compreende as etapas de tratamento das células de medula óssea *in vitro* com uma proteína de FTC $\beta$ 1, que selecciona uma população homogénea das células para posterior tratamento. As células seleccionadas podem então ser expandidas, depois do que um gene que codifica uma proteína terapêutica pode ser inserido nas células expandidas e depois expressar a proteína terapêutica. As células transduzidas podem então ser introduzidas num mamífero para produzir um resultado terapêutico.

## DESCRIÇÃO

### CÉLULAS SENSÍVEIS A FTC $\beta$ 1 DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA

#### Domínio da Invenção

A presente invenção tem por objecto células derivadas da medula óssea, um processo para sua selecção a partir da medula óssea e a utilização das células derivadas da medula óssea como veículos para a transferência de genes. Mais particularmente, a presente invenção tem por objecto a utilização de uma proteína do factor de transformação do crescimento  $\beta$ 1 (FTC $\beta$ 1) para a selecção de medula óssea de uma população de células, que são sensíveis à proteína de FTC $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1 na terminologia inglesa). As células seleccionadas podem ser depois ser utilizadas como veículos para a transferência de genes que codificam uma proteína terapêutica em mamíferos, incluindo seres humanos.

#### Antecedentes da Invenção

Os dois principais sistemas celulares associados com os ossos e com a medula são os sistemas de células tronco hemopoiéticas e os sistemas das células tronco do estroma. No sistema das células tronco do estroma, as células do tronco do mesênquima (também conhecidas como células progenitoras mesenquímicas) dão origem aos progenitores de muitos fenótipos diferenciados, incluindo osteócitos, crondócitos, miócitos, adipócitos, fibroblastos e células estromais da medula. Contudo, o termo "célula tronco" não tem uma definição fácil. De acordo com Maureen Owen (Bone and Mineral Research, pp. 1-25 (Elsevier Science Publishers 1985)), "não há uma definição rigorosa de células tronco. Elas têm elevada capacidade de auto-renovação ao longo da vida e a capacidade

de se diferenciarem numa variedade de populações de células funcionais". Owen em 1. No que respeita ao sistema das células tronco do estroma, Owen estabelece que

do mesênquima, do estroma, fibroblástica, reticular, do retículo e do feixe das fibras nucleares, são termos utilizados de forma intermutável para estas células do tecido conjuntivo, que também têm sido designadas por mecanócitos. O termo "fibroblástico" é normalmente utilizado para englobar todas estas células ...

condições de cultura que promovem o crescimento clonal de células fibroblásticas, incluem a utilização de soro bovino fetal, normalmente uma alteração completa e frequente do meio... e preparações de células únicas... Quando as células preparadas desta forma são postas em cultura *in vitro*, nas condições anteriores, a maioria das células hemopoiéticas morrem e as colónias fibroblásticas do estroma formam-se. As células da medula postas em cultura nestas condições genéricas dão origem a colónias fibroblásticas, cada uma delas derivada de uma única célula. Estas células crescem rapidamente até à confluência e são muitas vezes referidas como fibroblastos da medula.

Owen em 4, 6. Owen acrescenta que "a verdadeira complexidade da população das células tronco, considerando a heterogeneidade de ... clones examinados, não pode ser sobrestimada". Owen em 10.

Caplan et al. (patente de invenção norte-americana U.S. N°. 5.486.359) relatam que separaram uma população homogênea de células tronco do mesênquima humano a partir da medula óssea. Caplan et al. também descrevem processos para a ca-

racterização e a utilização de células tronco do mesênquima purificadas para fins de investigação, de diagnóstico e terapêuticos.

No processo de Caplan et al., os cilindros de medula óssea são centrifugados em meio de cultura complementado com lotes seleccionados (mas indefinidos) de soro bovino fetal. Faz-se uma nova suspensão do granulado de células lavadas, faz-se passar através de agulhas graduadas (primeiro com a medida 18 e depois com a 20), lavam-se, contam-se e colocam-se em placa. Alternativamente, os produtos de medula óssea aspirados são colocados em placa com um gradiente de Percoll, depois do que se recolhe uma fracção de baixa densidade e se coloca em placa, em condições de cultura normalizada. Em qualquer um dos casos, as células não aderentes são eliminadas na mudança do meio e as células remanescentes são deixadas para crescerem até à confluência, originando, de acordo com Caplan et al., uma população homogênea de células uniformes semelhantes a fibroblastos. Especificamente, Caplan et al., relatam que "as células tronco do mesênquima aderentes, retiradas dos ossos porosos da cabeça do fêmur ou aspiradas do ilíaco, têm uma morfologia similar, sendo quase todas fibroblásticas, com poucas células adipocíticas, poligonais ou redondas..." Coluna 19, linhas 46-49; Figura 1. Caplan et al., ainda descrevem que estas células fibroblásticas aderentes podem passar em condições de cultura normalizadas ou serem induzidas para se diferenciarem em células que formam ossos em certas condições.

Sabe-se que certas células progenitoras do mesênquima são capazes de se auto-renovarem e de sofrerem expansão na presença do factor de transformação do crescimento  $\beta 1$  (FTC $\beta 1$ ), uma citocina pleotrópica, com funções da autocrina e da paracrina.

O factor de transformação do crescimento  $\beta$  (FTC $\beta$ ), um péptido de 25 KDa, foi encontrado com abundância nas plaquetas e nos ossos, libertado em resposta a traumas dos tecidos e tem-se tornado, crescentemente, uma ferramenta importante para imunoregulação, cura de feridas e reparação de tecidos. O FTC $\beta$  é também um quimio-atractor para as células que têm origem no mesênquima e, como tal, recruta fibroblastos para o sítio da ferida, estimula a angiogénese e faz a síntese de novo das proteínas da matriz extracelular em concordância com a sobre-regulação de inibidores da degradação da matriz. Ver Roberts A.B., Sporn M.B.: The Transforming Growth Factor- $\beta$ s, pp. 420-472 (1990). Os FTC $\beta$ 1 e FTC $\beta$ 2 são agentes imunoreguladores potentes, que suprimem a proliferação e a função dos linfócitos T e B *in vitro* (Id.) e *in vivo* (Ver Wrann M, et al., "T Cell Suppressor Factor from Human Glioblastoma Cells is a 12.5 KD Protein Closely Relating to Transforming Growth Factor-beta", EMP. J. 6: 1633-36 (1987)). Por isso, o FTC $\beta$  parece desempenhar um papel crucial em distúrbios relevantes sob o ponto de vista clínico da vigilância imunitária, regeneração e reparação de tecidos. Além disso, a reparação após traumas do tecido, tais como, queimaduras, enfarte do miocárdio, isquémia e traumas cerebrais, assim como a cura de feridas cirúrgicas, podem ser aceleradas por uma única infusão sistémica ou uma aplicação local deste factor de crescimento do péptido. Ver Beck S.L., et al., "FTC- $\beta$ 1 Induces Bone Closure of Skull Defects", J. Bone Mineral Res. 6 (1991). Os efeitos terapêuticos da administração de FTC $\beta$  podem ser aumentados e/ou prolongados pelas suas funções pronunciadas de autocrina e de paracrina.

A captura de células tronco do mesênquima humano derivadas da medula óssea com uma proteína de fusão do factor de transformação do crescimento  $\beta$ 1 (FTC $\beta$ 1) já foi evidenciada em Gordon et al. 1995, Blood, 86, suplemento 1, página 998a.

## Sumário da Invenção

A presente invenção tem por objecto uma população homogénea de células sensíveis ao FTC $\beta$ 1 derivadas da medula óssea e um processo para a sua selecção da medula óssea, preferencialmente, da medula óssea humana.

As células sensíveis a FTC $\beta$ 1 derivadas de medula humana da presente invenção têm sido referidas na literatura científica recentemente publicada como células progenitoras do mesênquima ou células tronco do mesênquima. Ver E.M. Gordon, et al., Human Gene Therapy 8: 1385-94 (20 de Julho de 1997). Contudo, os requerentes reconhecem agora que as células sensíveis a FTC $\beta$ 1 derivadas da medula óssea devem ser mais apropriadamente designadas por "células progenitoras do pré-mesênquima" ou "células tronco do pré-mesênquima", dado que as células seleccionadas morfológicamente parecem estar numa forma precoce ou mais primitiva das células tronco do mesênquima ou das células progenitoras do mesênquima, como evidenciado pela forma redonda como a dos blastóides destas células em vez de uma forma como os fibroblastos normalmente associados com as células tronco do mesênquima. As células sensíveis a FTC $\beta$ 1 derivadas da medula óssea podem assim incluir uma população homogénea das células tronco do pré-mesênquima (também conhecidas como células progenitoras do pré-mesênquima) ou uma população homogénea de células do pré-mesênquima diferenciadas, tal como, as células do estroma. A população homogénea das células tronco do pré-mesênquima podem incluir células blastóides pluripotentes.

A selecção é realizada por tratamento de células da medula óssea *in vitro* com uma proteína do FTC $\beta$ 1, que selecciona das células uma população de células que são

sensíveis à proteína de FTC $\beta$ 1. As células seleccionadas podem ser depois expandidas numa cultura de células.

Noutro aspecto, a presente invenção tem por objecto um processo para a expressão de uma proteína recombinante, a partir de uma população homogénea seleccionada de células sensíveis a FTC $\beta$ 1 derivadas de medula óssea. As células podem ser transduzidas com um segmento de ADN, que codifica uma proteína terapêutica, para fazer com que as células expressem a proteína terapêutica. Num aspecto adicional, a presente invenção tem por objecto um processo para a introdução delas num receptor para produzir um resultado terapêutico.

A proteína do FTC $\beta$ 1 é uma proteína de fusão de FTC $\beta$ 1, que compreende um sítio de ligação da matriz extracelular, que é preferencialmente um sítio de ligação do colagénio. O sítio de ligação da matriz extracelular da proteína de fusão de FTC $\beta$ 1 pode então ser utilizado para atingir a proteína de fusão de FTC $\beta$ 1 com uma matriz extracelular, tal como colagénio. Num enquadramento, o sítio de ligação do colagénio é um sítio de ligação de colagénio derivado do factor de von Willebrand.

Ainda noutro aspecto, a presente invenção tem por objecto um processo por terapia de genes, que compreende as etapas de captura das células sensíveis a FTC $\beta$ 1 derivadas de medula óssea, em condições de pouco soro numa matriz de colagénio impregnada com uma proteína de fusão de FTC $\beta$ 1, que compreende um sítio de ligação do colagénio derivado do factor de von Willebrand (FTC $\beta$ 1-fvW) o qual atinge a proteína de fusão de FTC $\beta$ 1 com a matriz de colagénio. As células capturadas podem então expandir-se numa cultura de células para formar colónias de fêrias diferenciadas. Estas colónias de células expandidas podem então ser transduzidas *in vitro*



com um vector viral, que compreende um gene que codifica uma proteína terapêutica, em que o gene é expresso para produzir a proteína terapêutica. As células transduzidas podem então ser introduzidas num mamífero, tal como, um ser humano, para produzir um resultado terapêutico.

Num enquadramento particular da presente invenção, verificou-se que as células progenitoras do pré-mesênquima, isoladas com uma proteína de fusão de FTC $\beta$ 1-fvW, expandidas em cultura e transduzidas com um vector retroviral, continham o factor de codificação do gene IX, expresso a níveis significativos da proteína do factor IX. Além disso, quando as células transduzidas eram transplantadas para ratos imuno-competentes, o transgene do factor humano IX era expresso *in vivo*.

#### Breve Descrição dos Desenhos

As características, aspectos e vantagens da presente invenção serão compreendidos de uma forma mais completa quando se considerar a descrição detalhada que se segue, as reivindicações em anexo e os desenhos que as acompanham, em que:

A figura 1 é uma representação esquemática da estrutura de fusão do factor de von Willebrand-FTC $\beta$ 1 tratada por engenharia genética. A proteína expressa contém um marcador de purificação de histidina, um sítio de protease, uma sequência auxiliar de decapeptidos de ligação ao colagénio e a sequência de ADNC que codifica o fragmento activo maduro de FTC $\beta$ 1 humano.

A figura 2 mostra a proliferação das células de estroma da medula em várias concentrações de soro bovino fetal

(SBF). O número de células, desenhado no eixo vertical, está expresso em função da concentração no soro (% de SBF), ao longo de um período de tempo de 6 dias, desenhado no eixo horizontal.

A figura 3 contém fotografias de gel que mostram as secções de controlo coradas de hematoxilinaeosina (H & E), blocos de colagénio não tratados na figura 3(a) e blocos de colagénio tratados com FTC $\beta$ 1-fvW nas figuras 3(b) e 3(c), depois da retirada das culturas de medula óssea, passados 8 dias.

A figura 4 contém fotografias de gel demonstradas na figura 4(a), aspirados de medula óssea em cultura, em meio pobre em soro, que exibem a degeneração das células e a morte das células; na figura 4(b), sobrevivência de uma população primitiva de células de blastóides em géis de colagénio aumentadas por uma proteína de fusão recombinante de FTC $\beta$ 1 de ligação ao colagénio; na figura 4(c), expansão das células tronco capturadas após selecção, na presença de factores adicionais do soro; e na figura 4(d), formação de colónias de células tronco expandidas, revelando derivados de estroma/fibroblásticos.

A figura 5 contém fotografias de gel que mostram a diferenciação das células tronco capturadas de colagénio/FTC $\beta$ 1 numa linhagem osteogénica. A figura 5(a) mostra o controlo de aspirados de medula óssea em cultura de gel de colagénio, na ausência da proteína de fusão recombinante de FTC $\beta$ 1, enquanto a figura 5(b) mostra a expansão das colónias osteogénicas, na presença da proteína de fusão recombinante de FTC $\beta$ 1 e depois da subsequente cultura na presença de factores osteo-

indutivos (dexametasona, vitamina C e  $\beta$ -glicerofosfato). A figura 5(c) mostra a formação de "tecidos" osteogénicos, na presença de proteína de fusão de FTC $\beta$ 1 e de factores osteo-indutivos. A figura 5(d) é um alargamento da figura 5(c).

A figura 6 representa fotografias de gel que mostram na figura 6(a), o controlo dos aspirados de medula óssea em cultura em cavidades revestidas de colagénio, na ausência de FTC $\beta$ 1-fvW; na figura 6(b), a captura de uma população de células precursoras de blastóides em cavidades revestidas com colagénio, impregnadas com FTC $\beta$ 1-vWF; e na figura 6(c), células do pré-mesênquima da medula, transplantadas, a seguir à cultura e à expansão, na presença de FTC $\beta$ 1-fvW, reconstituição com soro e transdução com o vector LIXSNL.

A figura 7 mostra a detecção à base de transcriptase inversa-reacção em cadeia de polimerase (à base de TI-RCP) das sequências únicas do factor IX humano na medula óssea (coluna 2) e no pulmão (coluna 3) de ratos receptores com vinte oito dias após a transplantação do factor IX, células progenitoras do pré-mesênquima transduzidas num vector. Os ratos foram sacrificados para a detecção por TI-RCP das sequências do factor IX humano em vários órgãos do rato. AS bandas positivas que identificam as sequências do ADNc do factor IX humano (colunas 8 e 9) podem ver-se numa região de 180 pb de não homologia com as sequências do ADNc do factor IX do rato. As amostras vieram de vários tecidos de murino tal como se segue:

Coluna 1, LIXSNL/fígado; coluna 2, LIXSNL/medula óssea; coluna 3, LIXSNL/pulmão; coluna 4,

LXSNL/fígado; coluna 5, LXSNL/medula óssea; coluna 6, LIXSNL/rim; coluna 7, marcador de 1 Kb; colunas 8 e 9, fígado humano; coluna 10, branco; coluna 11, LIXSNL/baço; coluna 12, LXSNL/rim.

A figura 8 mostra os resultados da captura de subconjunto de precursores osteoblásticos obtidos da medula óssea por exposição das células a vários tipos de proteínas morfológicas dos ossos (PMOs, BMPs na terminologia inglesa) (rhOP-1, rhPMO-2 e bFGF). Tal como se mostra nas fotografias, estas populações de células possuem características distintas em termos do seu potencial menos proliferativo e mais proliferativo dos fenótipos.

A figura 9 mostra os resultados dos estudos da câmara óssea, em que o FTC $\beta$ 1 capturado e as células expandidas exibem capacidade de gerar cartilagem (muito mais com o FTC $\beta$ -1, FTC $\beta$ 1-F2 atingidos pelo colagénio), embora as capturadas com PMOs produzam osso.

#### Descrição Detalhada da Invenção

Tal como se indicou antes, a presente invenção tem por objecto células sensíveis de FTC $\beta$ 1 derivadas de medula óssea, um processo para sua selecção a partir da medula óssea e a utilização das células derivadas de medula óssea seleccionadas, como veículos celulares para a transferência de genes. A presente invenção demonstra que uma população homogénea de células sensíveis a FTC $\beta$ 1, derivadas de medula óssea, incluindo as células progenitoras do pré-mesênquima, pode ser seleccionada e expandida em virtude das suas respostas fisiológicas intrínsecas a FTC $\beta$ 1. A presente invenção ainda demonstra a utilidade destas células tratadas

para realizar abordagens de terapia com genes em mamíferos. Incluindo seres humanos.

Os requerentes demonstraram a captura, expansão, diferenciação e utilidade potencial de uma população distinta de células redondas de blastóides obtidas em condições de selecção rigorosas, em virtude de uma resposta de sobrevivência recentemente definida, provocada por um factor de crescimento definido. Nomeadamente, o FTC-beta está normalmente armazenado nas plaquetas e na matriz dos ossos donde se liberta em resposta a traumas mas, por outro lado, não está presente na circulação em geral. Tal como se disse antes, o FTC-beta desempenha um papel fundamental no recrutamento e diferenciação das células precursoras do mesênquima. Esta resposta fisiológica ao FTC-beta (proteínas de fusão) é essencial para a captura (isto é, a sobrevivência) destas células blastóides, que de outra forma não são fisicamente separáveis quer das células hematopoiéticas, quer de outras células do mesênquima com base na sua dimensão, densidade ou aderência. As células sensíveis a FTC-beta proliferam em resposta a factores do soro e formam colónias distintas dentro das matrizes do colagénio. A morfologia destas células é inicialmente blastóide e não fibroblástica, embora as células proliferativas sejam capazes de tornar visível a cito-diferenciação em células fibroblásticas e/ou osteogénicas, o que significa um precursor de mesênquima. Tal como se mostrou na figura 9, colocadas em câmaras ósseas, as células precursoras do pré-mesênquima capturadas por FTC-beta da presente invenção, formam cartilagem e não osso, ao contrário das células tronco capturadas por PMO, que exibem um fenótipo, *in vivo*, menos proliferativo e mais diferenciado (formação de osso).

A presente invenção tem por objecto um processo para a selecção de células sensíveis a FTC $\beta$ 1 derivadas de medula óssea, seleccionadas da medula óssea, o que compreende as etapas de tratamento das células de medula óssea *in vitro* com uma proteína de FTC $\beta$ 1, seleccionando assim as células de uma população de células que são sensíveis à proteína de FTC $\beta$ 1. As células seleccionadas podem ser expandidas na cultura de células. A presente invenção, num outro aspecto, tem por objecto um processo de expressão de uma proteína recombinante a partir de células derivadas da medula óssea, compreendendo a inserção de um segmento de ADN que codifica uma proteína terapêutica, nas células expandidas, para fazer com que as células expressem a proteína terapêutica.

A proteína de FTC $\beta$ 1 utilizada para o tratamento das células de medula óssea *in vitro* é uma proteína de fusão de FTC $\beta$ 1, que compreende um sítio de ligação de matriz extracelular. O sítio de ligação da matriz extracelular permite que a proteína de fusão de FTC $\beta$ 1 se ligue a uma matriz extracelular, tal como, uma matriz de colagénio. Um sítio de ligação preferido da matriz extracelular é assim um sítio de ligação de colagénio. Os vários tipos de matrizes de colagénio incluem géis e blocos. Esta ligação da proteína de fusão de FTC $\beta$ 1 a uma matriz extracelular, permite a captura das células derivadas da medula óssea, sensíveis a FTC $\beta$ 1, numa matriz extracelular.

As células sensíveis a FTC $\beta$ 1 derivadas de medula óssea da presente invenção, incluem as células tronco progenitoras do pré-mesênquima, também referidas como células progenitoras sensíveis a FTC $\beta$ 1 (CPST, TRPC na terminologia inglesa) e células diferenciadas derivadas da medula óssea, tal como, células do estroma.

A introdução de um segmento de ADN *in vitro* em células derivadas de medula óssea, pode ser conseguida por processos conhecidos, preferencialmente, por transdução de um vector viral, mais preferencialmente, um vector retroviral. Os processos não virais incluem a electroporação, a transfecção mediada por fosfato de cálcio, a micro-injecção e os proteolipossomas.

O segmento de ADN introduzido nas células derivadas de medula óssea no presente processo podem codificar qualquer uma das várias proteínas terapêuticas. O processo da presente invenção é particularmente útil para as abordagens da terapêutica genética para corrigir defeitos no sistema de homeostase da trombose. Exemplos de genes apropriados ou de segmentos de ADN apropriados incluem os que codificam o factor IX, o factor VIIIC humanos, o factor de von Willebrand, o activador do plasmogénio do tecido, a proteína C, a proteína S e a anti-trombina III.

A presente invenção também tem por objecto um processo para providenciar um receptor, incluindo um mamífero, com uma quantidade efectiva sob o ponto de vista terapêutico de uma proteína terapêutica, por meio da introdução das células derivadas da medula óssea, sensíveis a FTC $\beta$ 1, no receptor. As células derivadas de medula óssea, sensíveis a FTC $\beta$ 1, são tratadas *in vitro* antes da introdução no receptor, primeiro com uma proteína de FTC $\beta$ 1 para seleccionar as células sensíveis a FTC $\beta$ 1 das restantes ou dos componentes celulares contidos numa amostra de medula óssea e, em segundo lugar, para inserir nas células sensíveis a FTC $\beta$ 1 um segmento que codifica uma proteína terapêutica. As células transduzidas depois vão expressar uma quantidade efectiva sob o ponto de vista terapêutico da proteína terapêutica *in vivo* no receptor.

A presente invenção também tem por objecto um processo de terapia de genes que compreende a primeira etapa de captura das células derivadas de medula óssea, sensíveis a FTC $\beta$ 1, preferencialmente células progenitoras de pré-mesênquima, em condições de soro baixas numa matriz de colagénio (por exemplo, blocos e géis) impregnados com uma proteína recombinante de fusão de FTC $\beta$ 1, que compreende um sitio de ligação do colagénio, preferencialmente, derivado de um factor de von Willebrand, que atinge a proteína de FTC $\beta$ 1 com a matriz de colagénio e prolonga o seu semi-período de vida biológico. Ver Tuan T.L., et al., "Engineering, Expression and Renaturation of Targeted FTC-beta Fusion Proteins", Conn. Tiss. Res. 34: 1-9 (1996). As proteínas de fusão de FTC $\beta$ 1 tratadas por engenharia genética, incorporando o sítio de ligação do colagénio que se funde com um fragmento activo da proteína de FTC $\beta$ 1, estão ilustradas na figura 1, exibem propriedades funcionais que não existem na natureza. Ver Tuan T.L., et al.. Estas proteínas de fusão de FTC $\beta$ 1-fvW, atingidas pelo colagénio, mostraram funcionar eficientemente na captura de células progenitoras de blastóides, sensíveis a FTC $\beta$ 1. As estruturas de FTC $\beta$ 1 a que faltava o domínio de ligação do colagénio não foram tão eficientes.

O processo de terapia de genes da presente invenção compreende a expansão das células sensíveis a FTC $\beta$ 1 para formar colónias de células diferenciadas, seguidas de uma etapa de transdução das células expandidas *in vitro* utilizando processos de transferência de genes, incluindo transferências de genes mediadas por vírus e, preferencialmente, mediadas por retrovírus. Num enquadramento preferido, adiciona-se às células FTC $\beta$ 1, preferencialmente, de uma fonte purificada, durante as etapas de captura e de expansão. As células transduzidas podem então expressar a proteína terapêutica.



O processo de terapia dos genes também inclui a etapa de introdução das células transduzidas num mamífero para produzir um resultado terapêutico. Mais especificamente, e tal como se indica com mais detalhe a seguir, a presente invenção demonstra a utilidade das matrizes de colagénio impregnadas de FTC $\beta$ 1-fvW para isolar novas células alvo, como veículos para realizar a terapia de genes ex vivo.

Para otimizar as condições da cultura de células para efectivar a selecção ex vivo das células progenitoras sensíveis a FTC $\beta$ 1, adicionou-se às células de estroma de medula óssea concentrações várias de soro bovino fetal (SBF) e as células cresceram em meio essencial mínimo de Dulbecco (MEMD, DMEM na terminologia inglesa), durante 6 dias. A figura 2 mostra um decréscimo característico no número de células observado às 24 horas, seguido de um aumento dependente do soro nas contagens das células ao longo do tempo. Não se observou nenhum aumento na contagem das células, nas culturas complementadas com SBF a 1 % ou menos, enquanto as culturas complementadas com concentrações maiores do que 1 % de SBF, mostraram uma recuperação progressiva após um período de estacionamento de cerca de 3 dias. Com base nisto, utilizou-se SBF a 1 % e 0,1 % como as concentrações mínimas do soro para o desenvolvimento de condições favoráveis à sobrevivência das células sensíveis a FTC $\beta$ 1.

A figura 3 mostra secções de blocos de colagénio coradas com hematoxilinaeosina. Especificamente, a figura 3(a) mostra controlos, blocos não tratados, enquanto as figuras 3(b) e 3(c) mostram blocos tratados com FTC $\beta$ 1-fvW retirados das culturas de medula óssea passados 8 dias. Os blocos de colagénio não tratados, mostraram uma ausência uniforme de elementos celulares, enquanto as secções de blocos tratados com FTC $\beta$ 1-fvW revelaram uma população de células pequenas,

blastóides mononucleares, com cromatina nuclear grosseira e rodeada por pequenos núcleos nalgumas áreas com uma coroa estreita de citoplasma agranular azul. Ocasionalmente notou-se uma população de células pleomórficas, incluindo células blastóides e presumíveis derivados, tal como se mostra na figura 3(c). Ambos os tipos de células pareciam ter segregado proteínas da matriz extracelular de novo. Estas proteínas de matriz distinguem-se das fibras originais de colagénio.

Depois de se realizarem os estudos anteriores utilizando aspirados de medula óssea, observaram-se as culturas de células directamente em estudos adicionais, em que se investigou a selecção (captura) e expansão mitótica de células derivadas de medula de roedores, cultivadas em géis de colagénio. Comparando as figuras 4(a) e 4(b), mostra-se que a manutenção de uma população relativamente uniforme de células de blastóides requer a presença de proteínas de fusão de FTC $\beta$ 1-fvW dentro da matriz de colagénio. Tal como demonstrado pela figura 4(b), FTC $\beta$ 1-fvW aparentemente suportam a sobrevivência mas não a expansão destas células blastóides, em condições fracas do soro. Contudo, após a adição de SBF a 10 % à cultura de células, as células capturadas começaram a proliferar, como ficou evidente pela formação de doubletos de células, tal como se mostra na figura 4(c) e a formação de colónias multicelulares, tal como se mostra na figura 4(d). O facto das células blastóides capturadas terem uma forma de célula do mesênquima (ou célula do pré-mesênquima) foi confirmado, como se mostra na figura 5, pela adição de factores osteo-indutivos (dexametasona, vitamina C e  $\beta$ -glicerofosfato) ao meio de crescimento completo, que induziu a cito-diferenciação e a mineralização das colónias em expansão.

Utilizando um vector contendo o gene de  $\beta$ -galactosidase como um gene repórter, observou-se a eficiência da transdução tanto nas células de progenitores de pré-mesênquima derivadas da medula óssea, capturadas por FTC $\beta$ 1-fvW, tanto de roedores como humanas, variou de 20 a 30 %. Ao comparar a difusão do gene nas células tronco expandidas de FTC $\beta$ 1-fvW com as difundidas nas células diferenciadas com um fenótipo de origem mesênquimal, tanto as células tronco derivadas da medula, como as células estromais maduras, estão transduzidas com um vector retroviral, comportando um ADNc do factor IX humano (LIXSNL). O quadro I a seguir mostra a produção do factor IX depois da expansão das células seleccionadas, na presença de proteína de fusão de FTC $\beta$ 1-fvW, seguida da transdução das células com o vector LIXSNL. As células que foram capturadas e expandidas em resultado do tratamento com uma proteína de fusão de FTC $\beta$ 1-fvW ligadas ao colagénio, produziram quantidades significativas ( $\mu$ g) da proteína de factor IX por  $10^6$  células.

Também se observou que quando se complementava as culturas de células com FTC $\beta$ 1 purificado, isso induzia um dramático aumento (de dez vezes) na produção do factor IX.

#### QUADRO I

Produção do Factor IX em Células Tronco do Pré-mesênquima da Medula Humana após Expansão com uma Proteína de Fusão de FTC $\beta$ 1-fvW e Transferência de Genes Mediados por Vectores Retrovirais

Experiência	Factor IX $\mu$ g/ $10^6$ células/dia
Colagénio + FTC $\beta$ 1-fvW	5,8 $\pm$ 2,6
	n=4
Colagénio + FTC $\beta$ 1-fvW	53,7 $\pm$ 12,5
+ FTC $\beta$ 1	n=4
	p<0,001
* O antigénio do factor IX não foi detectado nas culturas transduzidas com vector de controlo.	

O nível do factor IX produzido por estas culturas de células estimuladas por FTC $\beta$ 1 era consideravelmente mais elevado do que os níveis produzidos por células maduras com origem no mesênquima após a transferência isolada do gene mediada por um vector retroviral. Contudo, estas culturas estimuladas de células progenitoras de pré-mesênquima, exibiram uma actividade coagulante relativamente baixa (actividade aglutinação de 0,1 mU/ng de proteína), sugerindo assim que as células eram imaturas sob o ponto de vista bioquímico e/ou tal como se vai ver mais à frente, não tinham desenvolvido ainda um sistema de  $\gamma$ -carboxilação competente.

Por comparação, observou-se uma eficiência de transdução similar (de cerca de 28 %) de um vector de  $\beta$ -galactosidase nas células diferenciadas do estroma da medula. O quadro II a seguir mostra a produção de factor IX em células de estroma da medula seleccionadas de G418 no seguimento da transdução de um vector contendo o gene do factor IX. A quantidade de factor IX activo sob o ponto de vista biológico segregado nestas culturas foi proporcional ao nível de antígeno, indicando um sistema de  $\gamma$ -carboxilação funcional e exibindo uma relação entre a actividade coagulante do factor IX natural em relação ao antígeno, consistente com a relação observada no plasma normal (1 mU de actividade de aglutinação/5 ng de proteína). O nível do factor IX produzido pelas células de estroma da medula, foi comparável aos níveis de expressão resultantes dos fibroblastos humanos. Ver Palmer, T.D., et al., "Production of Human Factor IX in Animals by Genetically Modified Skin Fibroblasts: Potential Therapy for Hemophilia B. Blood", 73: 438-445 (1989).

## QUADRO II

Produção de Factor IX em Células de Estroma da Medula Humana  
Após Transferência de Genes Mediados por Vectores e Selecção  
de G418

Número da Amostra	Antigénio do Factor IX $\mu\text{g}/10^6$ células/dia	Actividade de Agregação do Factor IX mU/ $10^6$ células/dia
I	1,3	258,0
II	0,3	52,5
III	0,3	68,0
IV	0,3	60,0
* Os dados tabulados são os resultados de ensaios em duplicado. O antigénio do factor IX e a actividade de agregação foram detectados em culturas, transduzidas com o vector de controlo.		

Realizou-se um estudo piloto para demonstrar a transplantação das células de progenitor transduzidas, conforme descrito antes, na descendência de ratos. Tal como se mostra na figura 6(b), as células sensíveis a FTC $\beta$ 1-fvW da medula óssea de ratos B6CBA foram capturadas de matrizes de colagénio/FTC $\beta$ 1-fvW, em condições de soro pobre (SBF a 1 %), durante 5 dias, após os quais, tal como se mostra na figura 6(c), as culturas seleccionadas foram então reconstituídas em meio de crescimento completo (D10), durante 2 dias. As culturas de células expandidas foram então transduzidas com um vector LIXSNL na presença de 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de polibreno. No 21º dia, fez-se uma infusão de  $1 \times 10^5$  células numa veia da cauda do rato receptor e colheram-se amostras de sangue de 7 em 7 dias da cauda do rato, para analisar o antigénio do factor IX.

No momento da transplantação, verificou-se que a produção média do factor IX era de 2,8  $\mu\text{g}/10^6$  células/24 horas, com uma actividade de agregação média de 676 mU/ $10^6$  células/24 horas e uma taxa de actividade de agregação de 1

mU até 4,2 ng de proteína (n=3). Injectando células progenitoras transduzidas de LIXSNL através da veia da cauda do rato imuno-competente (n=3) produziram-se níveis detectáveis *in vivo* de factor IX humano, especificamente, até 14,6 ng de factor IX humano/mL de plasma no dia 7, 9,7 ng/mL 2 duas semanas após a transplantação, seguido de um decréscimo até níveis não detectáveis 28 dias após a transplantação. O nível esperado de expressa do transgene do factor IX foi estimado com base na quantidade de factor IX produzida em culturas de células progenitores transduzidas de ratos, medido no momento da transplantação, utilizando a fórmula:

$$\text{Nível de factor IX (Esperado, ng/mL)} = \frac{\# \text{ de células transplantadas} \times \text{produção de factor IX (ng/célula/24 hr)}}{\text{p/kg} \times \text{volume de plasma (mL)}} \times \frac{t_{1/2} \text{ (hrs)}}{24 \text{ hrs}}$$

em que "# das células transplantadas", era  $1 \times 10^5$ , significado de "produção de factor IX" média foi de 2,8 µg/10<sup>6</sup> células por 24 horas, significado de "peso (p)/kg X volume de plasma (mL)" foi de 20 gm para um volume de plasma de 1 mL (50 mL/kg) e um semi-período de vida ( $t_{1/2}$ ) para o factor IX recombinante foi de 24 horas. Os níveis médios do factor IX de plasma de 14,6 ng/mL e 9.7 ng/mL observados nos três ratos transplantados nos dias 7 e 14, respectivamente, aproximam-se bastante do nível previsto de cerca de 14 ng/mL.

Tal como se mostra na figura 7, os transcriptos do factor IX humano foram detectados por TI-RCP na medula óssea e nos pulmões dos animais tratados, mas não no fígado, nem no rim e nem no baço.

As implicações terapêuticas da presente invenção para a terapia de genes são substanciais. Em particular, existe um potencial de utilização da tecnologia das células tronco mio-fibro-osteogénicas para terapias do gene fetal de distrofia muscular, distúrbios do tecido conjuntivo, distúrbios da

armazenagem de lípidos e distúrbios do esqueleto, assim como, hemofilia. Além disso, a terapia somática de genes pode tornar o tratamento óptico para a hemofilia B (deficiência de coagulação do factor IX).

Além disso, a terapia dos genes para o tratamento da hemofilia B pode não exigir uma expressão regulada, precisa, nem sítios específicos de integração dos genes. Embora se tenham encontrado níveis de factor IX tão altos como 150 % em indivíduos saudáveis, um nível de factor IX de apenas 5 % poderá eliminar doenças incapacitantes causadas por hemorragias recorrentes das articulações. Dado que factor IX normalmente circula no plasma, qualquer célula tratada por engenharia genética, que tenha acesso vascular e que produz níveis suficientes de factor IX funcional, pode ser uma fonte contínua *in vivo*, obviando assim a necessidade de transfusões repetidas. As células progenitoras do pré-mesênquima, em particular, são um candidato atractivo devido à sua capacidade de auto-renovarem e de se diferenciarem em fenótipos segregadores presentes na medula óssea.

A presente invenção será ilustrada em detalhe nos exemplos que se seguem. Estes exemplos são incluídos com fins ilustrativos e não devem ser considerados como um limite à presente invenção.

#### Exemplo 1

##### Produção de uma Proteína de fusão Recombinante de FTC $\beta$ 1-fvW

Tratou-se por engenharia genética um vector de expressão procariótico para produzir uma proteína de fusão tripartida, conforme se mostra na figura 1, consistindo num marcador de purificação de 6 x His, um sitio auxiliar de ligação do

colagénio derivado do factor de von Willebrande uma sequência de ADNc que codifica o fragmento activo, maduro, de FTC $\beta$ 1 humano (FTC $\beta$ 1-fvW). O processo de preparação das proteínas de fusão de FTC $\beta$ 1-fvW constitui o tema do pedido de patente de invenção sequencial norte-americana, co-pendente, U.S. N°. 08/465.772, registada em 6 de Junho de 1995 e aqui incorporado como referência. Ver também Tuan T.L., et al., "Engineering, Expression and Renaturation of Targeted FTC-beta Fusion Proteins", Conn. Tiss. Res. 34: 1-9 (1996), também aqui incorporadas como referência.

Uma proteína de fusão expressa do vector anterior foi isolada e purificada até se tornar homogénea, a partir de corpos de inclusão de E. coli utilizando a cromatografia de quelatos de níquel, solubilizando com ureia 8 M e renaturando por redobragem oxidativa, em condições optimizadas de redox. Ver o pedido de patente de invenção norte-americana U.S. série N°. 08/465.772, aqui incorporado como referência; Ver também Tuan T.L., et al. A actividade biológica desta estrutura foi então avaliada por meio de ensaios de proliferação das células *in vitro*, utilizando FTC $\beta$ 1 purificado como um controlo padronizado.

## Exemplo 2

### Preparação de Matrizes de Colagénio

Prepararam-se matrizes de colagénio sólidas tal como foi descrito previamente por Nimni e colaboradores. Ver Nimni et al., Biotechnology 17:51-82 (1980). Especificamente, cortaram-se círculos de 5 mm a partir de folhas de colagénio (espessura de -1 mm), esterilizaram-se com etanol a 70 %, lavaram-se em MEMD e incubaram-se com FTC $\beta$ 1-fvW (50  $\mu$ L/bloco;



1 µg), durante 2 horas, a 37 °C, antes de se fazer a cultura com aspirados da medula óssea em placas de 6 cavidades.

### Exemplo 3

#### Estabelecimento das Condições Iniciais da Cultura para a Selecção de Células Sensíveis a FTCβ1

Para estabelecer as condições mínimas de crescimento requeridas para a selecção de células sensíveis a FTCβ1, monitorizou-se a taxa de células de estroma maduras, aderentes, por meio da contagem de células em cultura contendo MEMD complementado com concentrações variáveis de SBF (Biowhittaker). A concentração mais elevada de SBF (0,5 a 1 %) que originou um precipitado, estava dentro de um número de células sem recuperação significativa ao longo de 6 dias, conforme mostrado na figura 2, foi utilizada para um meio de selecção de sucessivas experiencias. Colocou-se em cada uma das 6 cavidades da placa (Falcon), aproximadamente,  $1 \times 10^6$  células normais de medula óssea humana (obtidas do USC Norris Hospital) contendo 1) blocos de colagénio tratados com FTCβ1-fvW, 2) blocos de colagénio não tratados (diâmetro de 5 mm) ou 3) uma camada fina de colagénio da cauda do rato, do tipo 1 (Becton-Dickenson), pré-incubado com a proteína de fusão de FTCβ1-fvW. As células cresceram em condições mínimas do soro: SBF a 1 % em MEMD complementado com 200 µg/mL de ampicilina. O meio foi substituído com MEMD-SBF a 1 %, de 4 em 4 dias, durante 12 dias, ao fim dos quais o meio foi substituído por SBF a 10 % antes da transdução das células. Retirou-se o bloco de colagénio tratado com FTCβ1 ou fvW ou não tratado, de 4 em 4 dias, durante 12 dias, fixou-se em formalina a 10 %, embebeu-se em parafina, seccionou-se e corou-se com hematoxilinaeosina para fazer o exame histológico.

#### Exemplo 4

##### Captura e Expansão de Células Progenitoras de Pré-mesênquima em Géis de colagénio

Obtiveram-se os aspirados de medula óssea dos ratos Fisher de um mês eutanizados. Lavou-se tecido da medula óssea do eixo médio do fêmur, em MEMD contendo penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/mL). Recolheram-se então as células de medula óssea vertendo várias vezes a medula para seringas ajustada com uma agulha de dimensão 18. Depois, aglomeraram-se as células por centrifugação a 1.000 rpm, durante 5 minutos, fez-se uma nova suspensão em meio isento de soro e contaram-se com um hemocitómetro.

Preparou-se colagénio do tipo 1 do tendão da cauda do rato, conforme descrito por Nimni et al. Especificamente, recolheram-se tendões da cauda do rato e lavaram-se com 1X SBF, foram diferidos durante a noite com pepsina (0,5 mg/mL), precipitaram duas vezes com NaCl 1 M (pH 7,5) e fez-se a sua diálise em ácido acético 0,5 M, seguida da diálise em HCl 0,001 N. Determinou-se a concentração do colagénio por meio de um ensaio com hidroxiprolina, enquanto se confirmava a sua pureza por meio de um mapeamento a 2-D do péptido, conforme descrito por Benya et al., Collagen Res 1: 17-26 (1981). Diluiu-se 3 mg/mL de colagénio, três vezes, com 3X MEMD para se fazer uma solução de 1X colagénio e depois ajustou-se o pH para 7,5 e armazenaram-se aliquotas a 4 °C.

Fez-se uma suspensão do aglomerado de células lavadas em 10 µL de meio isento de soro e 200 µL de colagénio neutralizado e, em seguida, adicionou-se 10 µL de FTCβ1-fvW recombinante ou meio de controlo. As misturas de células/colagénio foram depois transferidas para placas de cultura de tecido

com 24 cavidades e incubadas a 37 °C, durante 30 minutos, até que as moléculas de colagénio se agregaram em fibrilos, fixando assim as células dentro dos géis de colagénio. Sobrepos-se então uma camada de 0,5 mL de SBF a 0,5 % em MEMD sobre o gel e incubaram-se as células a 37 °C, durante 7 dias, sem alterar o meio. Passados 7 dias de privação de soro, substituiu-se o meio por meio D10, que foi depois mudado de 3 em 3 dias. Sete dias depois da reconstituição com meio D10, complementaram-se culturas seleccionadas com agentes osteo-indutivos: dexametasona  $10^{-8}$  M, ácido ascórbico  $2,8 \times 10^{-4}$  M e fosfato de  $\beta$ -glicerol 10 mM em meio D10.

#### Exemplo 5

#### Transdução de Células Seleccionadas de FTCB1 e Células de Estroma de Medula com $\beta$ -galactosidase e Vectores Retrovirais do Factor IX (LIXSNL)

As células sensíveis a FTC $\beta$ 1-fvW capturadas dentro de blocos de colagénio (ou em placas revestidas de colagénio) e as células de estroma de medula humana, seleccionadas por colocação diferencial em placa em meio MEMD-SBF a 10 % (D10), foram expostas durante 2 horas tanto ao vector de  $\beta$ -galactosidase (G1BgSvNa) como a um vector do factor IX (LIXSNL), na presença de 8  $\mu$ g/mL de polibreno. As designações G1BgSvNa e LIXSNL indicam a ordem do promotor e as regiões de codificação (G1 ou L = MoMuLV LTR; Bg = ADNc de  $\beta$ -galactosidase; IX = ADNc do factor IX humano; Sv ou S = promotor SV40; Na ou N = gene de fosfotransferase de neomicina). Os títulos dos vectores foram de  $1,3 \times 10^6$  cfu/mL para G1BgSvNa e  $1 \times 10^6$  cfu/mL para LIXSNL. O vector LIXSNL, que contém apenas o gene resistente a neomicina, serviu como o vector de controlo. Os vectores retrovirais G1BgSvNa e LIXSNL foram providenciados como clones de células produtoras

de PA317 pela Genetic Therapy, Inc., Gaithersburg, MD e Dr. Dusty Miller, University of Washington, Seattle, Washington, respectivamente.

Passadas 48 horas, fixaram-se os blocos de colagénio com paraformaldeído e coraram-se com o corante X-gal ( $\beta$ -galactosidase) para detectar as células que produzem  $\beta$ -galactosidase citoplásmica. As células do estroma da medula transduzidas com o vector de  $\beta$ -galactosidase foram também coradas com o corante X-gal antes e depois da selecção de G418. A eficiência da transdução das células do estroma foi determinada em células transduzidas, não seleccionadas, por meio da determinação do número de células coradas de azul em 300 células contadas. Este número foi então expresso como a percentagem de células coradas de azul. Ver Skotzko M.J., et al., "Retroviral Vector-mediated Gene Transfer of Antisense Cyclin G1 (CYCG1) Inhibits Proliferation of Human Osteogenic Sarcoma Cells", Cancer Research 55: 5493-5498 (1995). A intervalos seriados, recolheu-se o meio das culturas de células transduzidas com factor IX e vectores de controlo e armazenaram-se em aliquotas a -70 °C, até se fazer o ensaio de actividade de agregação do factor IX e antigénio.

Mediu-se a actividade coagulante do factor IX tal como descrito por Gordon E.M., et al., "Characterization of Monoclonal Antibody-purified Factor IX Produced in Human Hepatoma (HepG2) Cell Cultures after Retroviral Vector-Mediated Transfer", J. Int. Pediatr. Hematol. Oncol. 2: 185-191, (1995), utilizando uma modificação do tempo parcial de tromboplastina enquanto se media a quantidade do antigénio do factor IX utilizando técnicas de radio-imuno-ensaio específicas, conforme descrito por Gordon E.M., et al., "Expression of Coagulation Factor IX (Christmas factor) in Human Hepatoma (HepG2) Cell Cultures after Retroviral Vector-

Mediated Transfer", Amer. J. Pediatr. Hematol. Oncol. 15: 195-203 (1993). Qualquer elemento significativo nas diferenças entre os grupos foi analisada por meio de uma análise da variância. Ver Dixon W.J., et al., BMDP Statistical Software (Berkley: University of California Press, 1990).

#### Exemplo 6

#### Transplantação de Células Progenitoras do Pré-mesênquima de Murina, Transduzidas com um Vector Retroviral do Factor IX (LIXSNL)

Capturaram-se células sensíveis a FTC $\beta$ 1 a partir da medula óssea de ratos imuno-competentes B6CBA, de 20 gm, com 6 semanas de idade (Jackson Labs, Barr Harbor, Maine), em placas impregnadas com FTC $\beta$ 1-fvW revestidas com colagénio, em condições de soro pobre (MEMD-SBF a 1 %), durante 5 dias. Reconstituíram-se então as culturas em meio D10 (MEMD-SBF a 10 %). Fez-se a transdução das culturas expandidas ao 7º dia com o vector do factor IX LIXSNL ou o vector de controlo LXSNNL, na presença de 8 µg/mL de polibreno e manteve-se em D10 durante mais 2 semanas. No 21º dia, fez-se uma infusão de  $1 \times 10^5$  células na veia da cauda do rato da mesma espécie (n = 3 para cada grupo). Recolheram-se amostras de sangue de 7 em 7 dias a partir da cauda do rato, para realizar um ensaio do antigénio do factor IX.

#### Exemplo 7

#### Análise por Reacção em Cadeia de Polimerase à Base de Transcriptase Inversa (RCP-TI) do Transgene do Factor IX Humano em Órgãos de Murinos

Isolou-se o ARN total de diferentes órgãos de ratos tratados no exemplo 6, pelo processo do isotiocianato de guanidínio, conforme descrito por Chormczynski P., et al., "Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction", Anal. Biochem. 192:156-59 (1988). Sintetizou-se a primeira hélice do ADNc do ARN total por transcriptase inversa, conforme descrito pelo kit do ciclo do ADNc da Invitrogen (Invitrogen, San Diego CA), seguido de amplificação por RCP. Cada reacção num volume de 20 µL continha 1 µg de ARN, 1 µg de iniciador aleatório e 5 unidades de transcriptase inversa de AMV.

Aqueceu-se primeiro em conjunto, a 65 °C, o ARN e iniciadores aleatórios para eliminar a sua estrutura secundária e depois colocaram-se à temperatura ambiente durante 2 minutos. Realizaram-se então as reacções subsequentes 1X num tampão de transcriptase inversa compreendendo dNTPs 5 mM, pirofosfato de sódio 4 mM e 5 unidades de transcriptase inversa, a 42 °C, durante 60 minutos. Aqueceu-se a amostra a 95 °C, durante 2 minutos, para desnaturar o híbrido de ARN-ADNc. Para ampliar o gene do factor IX humano por RCP, prepararam-se iniciadores utilizando a região do gene do factor IX dentro da qual ocorre uma diferença entre a homologia das sequências dos aminoácidos do ADNc humano e de rato.

Os oligonucleótidos utilizados para efectuar a amplificação por RCP da sequência do factor IX humano, foram os seguintes: (707) 21-mer 5' ACT CAA GGC ACC CAA TCA TTT 3' paralelos; (708) 5' AAC TGT AAT TTT AAC ACC AGT TTC AAC 3'. Adicionalmente, utilizou-se ARN de fígado humano como um controlo positivo para a reacção de amplificação.

O ADNc sintetizado a partir da reacção anterior foi desnaturado, primeiro a 94 °C, durante 5 minutos, depois a 80

°C, durante 1 minuto, seguido de 60 °C, durante 45 segundos (etapa 1). Aqueceu-se então a amostra a 72 °C, durante 2 minutos (etapa 2), seguida de aquecimento a 94 °C, durante 1 minuto, 60 °C, durante 45 segundos e 72 °C durante 10 minutos (etapa 3). Realizaram-se as etapas 1 e 2 apenas 1 vez, enquanto a etapa 3 foi realizada 30 vezes. Depois da reacção estar completa, passaram-se as amostras por géis de agarose a 2,5 % para se visualizarem as bandas do factor IX, conforme demonstrado pela figura 7.

De acordo com isto, as verificações anteriores demonstram que FTCβ1 pode ser utilizado num protocolo de terapia com genes, em que as células derivadas de medula óssea, preferencialmente, as células tronco pluri-potentes, são os alvos desejados para a libertação de um gene num indivíduo.

Lisboa, 21 de Agosto de 2008

## REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a obtenção de uma população de células blastóides, redondas, provenientes da medula óssea, caracterizado pelo facto de as células serem células do pré-mesênquima que sobrevivem, mas não se expandem, na presença de FTC $\beta$ 1, em condições de baixos níveis séricos, compreendendo o processo:
  - (a) o tratamento de células de medula óssea em condições de baixos níveis séricos numa matriz, em que a matriz é constituída por uma proteína de fusão de FTC $\beta$ 1 que compreende um sítio de ligação do colagénio derivado do factor de von Willebrand, em que a proteína de fusão está funcionalmente associada a um gel de colagénio e as células de medula óssea estão retidas dentro do gel de colagénio, e
  - (b) a selecção da referida população de células.
2. Processo para expressar uma proteína recombinante a partir de células derivadas de medula óssea, caracterizado pelo facto de compreender as etapas de:
  - (a) selecção de uma população de células provenientes de medula óssea, de acordo com o processo da reivindicação 1; e
  - (b) inserção, em células sensíveis a FTC $\beta$ 1, de um segmento de ADN que codifica uma proteína terapêutica, em que as células sensíveis a FTC $\beta$ 1 expressam a proteína terapêutica.



3. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de as células de medula óssea serem células humanas.
4. Processo de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo facto de as células sensíveis a FTC $\beta$ 1 serem células progenitoras do pré-mesênquima ou células do estroma.
5. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo facto de as células progenitoras do pré-mesênquima serem células blastóides, pluri-potentes.
6. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 3 a 5, caracterizado pelo facto de o segmento de ADN ter sido inserido nas células sensíveis a FTC $\beta$ 1 *in vitro* por meio de um vector viral.
7. Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de o vector viral ser um vector retroviral.
8. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 2 a 7, caracterizado pelo facto de o segmento de ADN codificar o factor IX humano.
9. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de compreender ainda as etapas de:
  - (a) expansão da população de células seleccionada para formar colónias de células diferenciadas; e
  - (b) transdução das células expandidas *in vitro* com um vector viral compreendendo um gene de codificação de uma proteína terapêutica, fazendo assim com que

as células transduzidas expressem uma quantidade efectiva sob o ponto de vista terapêutico da proteína terapêutica.

10. Processo para a produção de uma composição farmacêutica, caracterizado pelo facto de compreender as etapas do processo da reivindicação 9, útil para a terapia de genes.
11. Processo de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizado pelo facto de se fornecer FTC $\beta$ 1 adicional durante as etapas de (a) e (b).
12. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 9 a 11, caracterizado pelo facto de as células sensíveis a FTC $\beta$ 1, derivadas de medula óssea, serem células progenitoras do pré-mesênquima ou células de estroma.
13. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 9 a 11, caracterizado pelo facto de o vector viral ser um vector retroviral.

Lisboa, 21 de Agosto de 2008

## Proteína de Fusão de fvW-FTC $\beta$

---

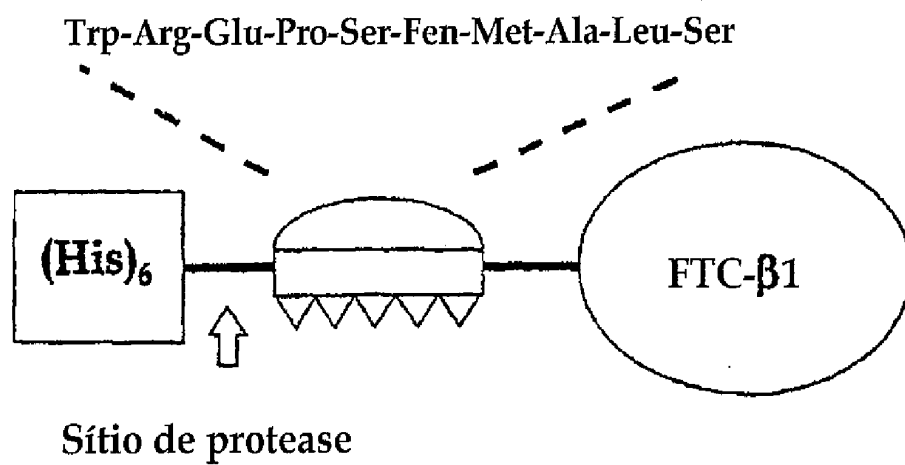


Figura 1

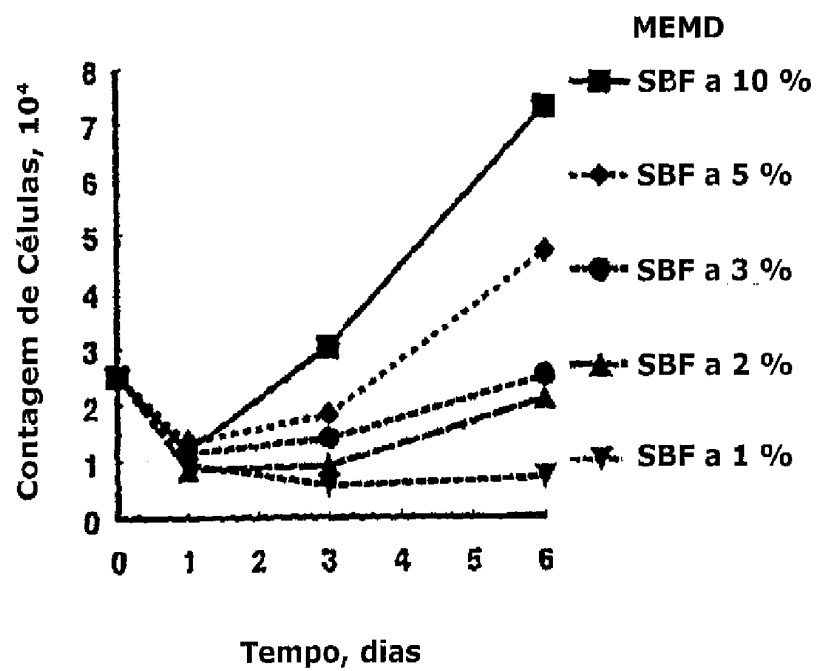


FIGURA 2

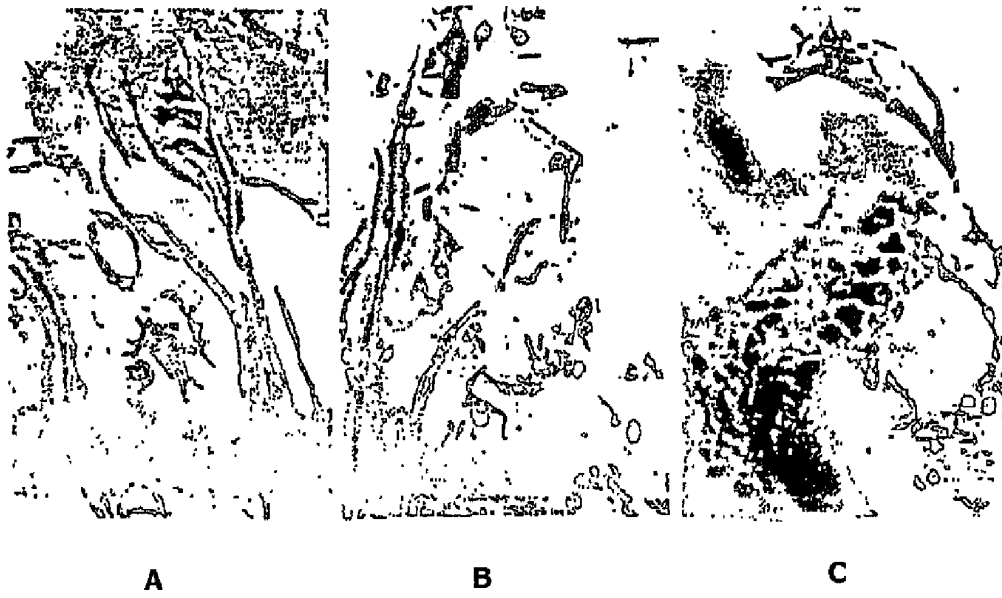


FIGURA 3

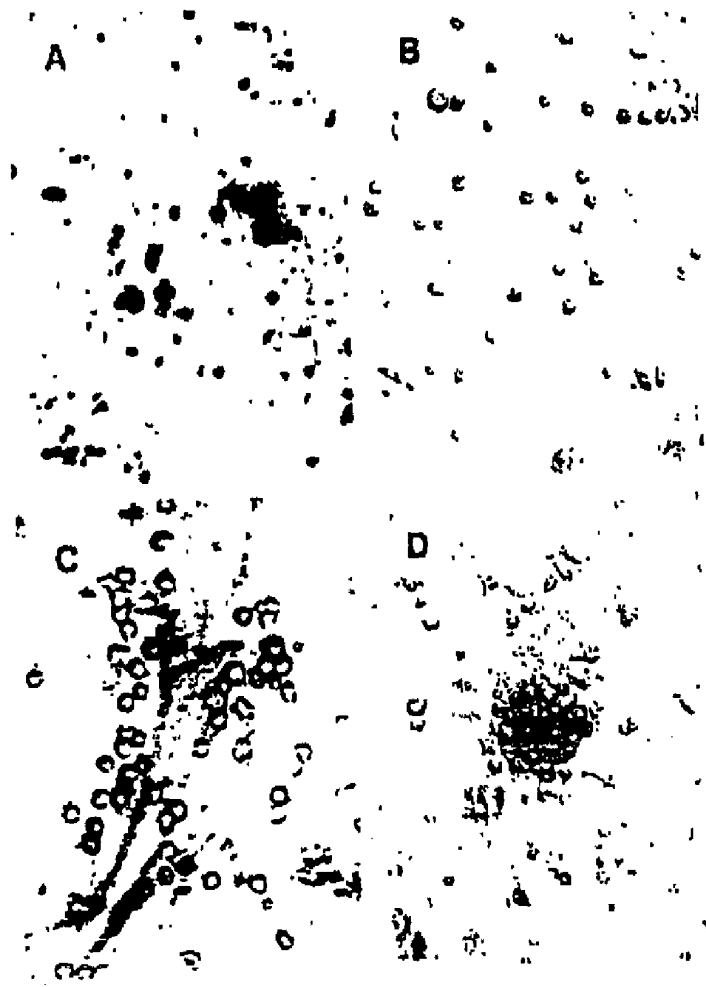


FIGURA 4

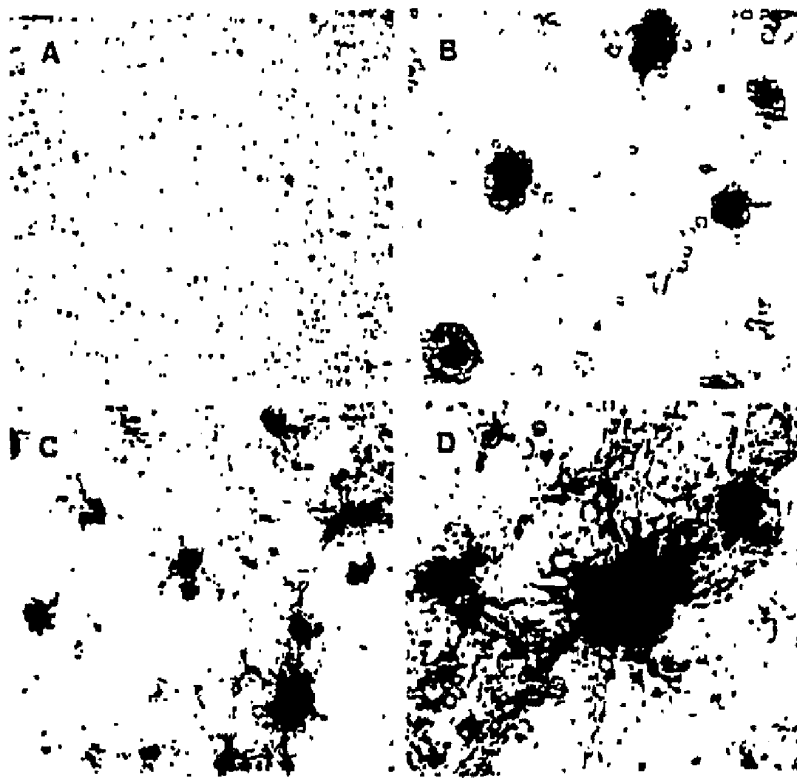


FIGURA 5

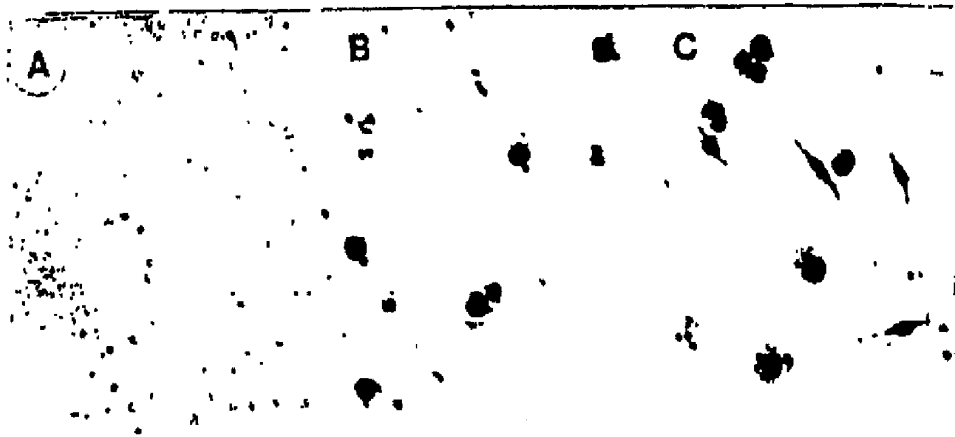


FIGURA 6



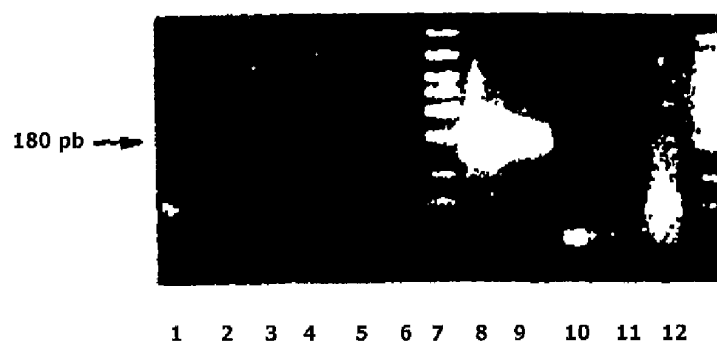


FIGURA 7



FIGURA 8

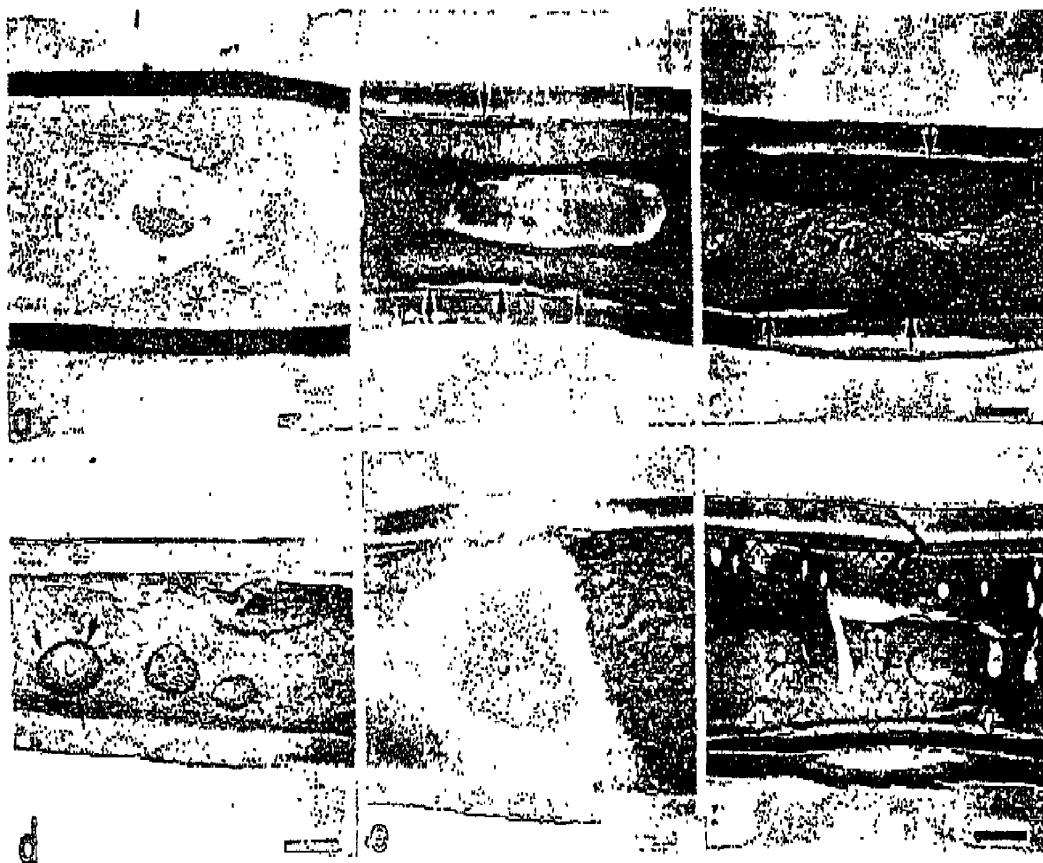


FIG. 9 Secções sagitais embebidas em parafina histológica das câmaras de difusão explantadas passados 28 dias contendo células tratadas em condições experimentais diferentes (a, controlo; b, FTCh- $\beta$ 1; c, FTCrh- $\beta$ 1-F2; d, CPrh-1; e, PMOrh-2; f, FGFb). dot, paredes da câmara de difusão (filtros Millipore); asterisco, tecido fibroso adjacente à parede; ft, tecido fluido; c, cartilagem; b, osso; setas, tecido pericôndrico que rodeia a cartilagem; setas abertas, tecido fibroso que aparece próximo das paredes da câmara. Barra, 500  $\mu$ m.

FIGURA 9