

(11) Número de Publicação: PT 651788 E

(51) Classificação Internacional: (Ed. 6)
C12N005/08 A G01N033/50 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1993.07.07	(73) Titular(es): AUGUSTINUS BADER HINTER DEN LANGEN HOFEN 16 D-31275 LEHRTE DE
(30) Prioridade: 1992.07.08 DE 4222345	
(43) Data de publicação do pedido: 1995.05.10	(72) Inventor(es): AUGUSTINUS BADER DE
(45) Data e BPI da concessão: 2000.03.15	(74) Mandatário(s): JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DO SALITRE, 195 R/C DTO 1250 LISBOA PT

(54) Epígrafe: PROCESSO PARA A CULTURA DE UM TIPO DE CÉLULAS EM CO-CULTURA COM CÉLULAS HEPÁTICAS

(57) Resumo:



FOLHA DO RESUMO

PAT. INV. ☒	MOD. UTI. ☐	MOD. IND. ☐	DES. IND. ☐	TOP. SEMIC. ☐	CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)
N.º 651.788 (11) DATA DO PEDIDO ____/____/____ (22)					

REQUERENTE (71) **BADER, Augustinus, alemão, industrial, residente em Hinter den**
(NOME E MORADA)

Langen Höfen 16, D-31275 Lehrte, Alemanha

CÓDIGO POSTAL _____

INVENTOR(ES) / AUTOR(ES) (72)

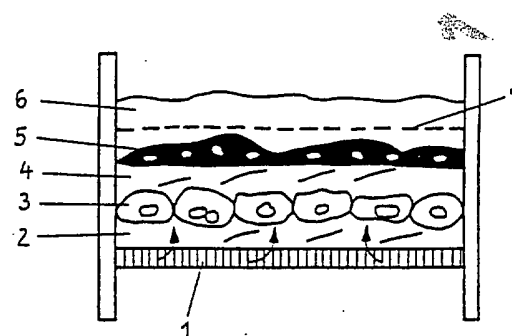
REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S) (30)

DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	N.º DO PEDIDO

EPÍGRAFE (54)

**"PROCESSO PARA A CULTURA DE UM TIPO DE
CÉLULAS EM CO-CULTURA COM CÉLULAS
HEPÁTICAS"**

FIGURA (para interpretação do resumo)



RESUMO (max. 150 palavras) (57)

Num processo para a cultura de um tipo de células, em co-cultura, realiza-se uma cultura de células hepáticas (3), num suporte (1), em sanduíche, entre as quais ou sobre as quais se coloca um segundo tipo de células (5) a investigar.

Descrição

“Processo para a cultura de um tipo de células em co-cultura com células hepáticas”

A invenção refere-se a um processo para a preparação, in vitro, de produtos de células hepáticas e à possibilitação da acção destes produtos num segundo tipo de células, num sistema celular de ensaio estável.

Até ao presente, não é conhecido qualquer sistema de ensaio in vitro estável funcional para células eucariotas, no qual possa investigar-se a influência de medicamentos ou substâncias químicas e igualmente os seus metabolitos, em qualquer tipo de células, relativamente à totalidade da sua acção.

Um sistema de ensaio que pode ser operado em condições de “in vivo” é, no entanto, de uma particular importância para:

1. O desenvolvimento de medicamentos precursores. Como exemplo disso, mencionam-se os pré-citostáticos que, por meio de uma metabolização, isto é, uma conversão enzimática, no fígado, em substâncias melhor dissociáveis são convertidas para a sua forma tóxica para um tumor. Uma forma precursora deste género, ministrada a um paciente, apresenta menos efeitos secundários para todo o organismo. Isso significa que tais substâncias representam o caso ideal para os medicamentos inibidores do cancro.

2. Uma identificação de substâncias provocadoras de mutações, ou cancerígenas. São conhecidas determinadas substâncias, que aparecem no ambiente, primariamente não cancerígenas, mas que depois de recebidas no organismo humano e sujeitas à metabolização são activadas e desse modo se tornam cancerígenas.

3. Para pesquisa de toxicidade. Como é sabido, os medicamentos ou

substâncias químicas que vão sendo descobertos têm de ser estudados relativamente à sua potencial acção tóxica. Mas muitos medicamentos actuam, sobretudo através da sua metabolização e da capacidade de desintoxicação notavelmente diferente, em função da espécie, de maneira tóxica.

4. Para o estudo das interacções. Significa isto as acções recíprocas entre os diferentes tipos de células.

Nos casos das alíneas 1 a 3, trata-se em especial de substâncias que só depois de uma metabolização se convertem na sua "forma activa" actuante. É então conhecido, para o seu ensaio, ministrar as substâncias a animais ou aplicar as mesmas, depois de uma metabolização numa mistura de enzimas, a determinados tipos de células, ou ainda fazer o estudo num sistema de cultura monocamada tradicional, entre células hepáticas e um outro tipo de células.

Nestes processos conhecidos é inconveniente, entre outras coisas, o facto de haver diferenças graves no modelo da formação dos metabolitos, não só entre as diferentes espécies de animais como também, especialmente, entre o homem e os animais. Isto significa que todas as substâncias cuja forma activa ou tóxica só pode surgir depois de uma metabolização num sistema metabólico humano não podem ser avaliadas por estudos em animais.

Por esta razão, procurou-se já estudar diversos tipos de células em processos de co-cultura com células hepáticas (ver, por exemplo, WO 84/04 325 e "Annals of the New York Academy of Sciences" 349, 1980, 264-272). Em todos estes processos conhecidos de co-cultura existe, no entanto, o problema de, imediatamente após a fixação, se estabelecer uma perda funcional dos hepatócitos, isto é, as células hepáticas, na cultura, visto não terem sido levadas em conta

exigências fundamentais específicas dos hepatócitos e biológicas das células e não poderem ser tidos em conta modos de proceder com isso relacionados. Por isso, não têm grande sentido os estudos de longo prazo com tais sistemas. Isso é tanto mais importante quanto é certo que, como é sabido, o carácter cancerígeno de uma matéria só se evidencia após ter decorrido muito tempo.

No processo de co-cultura conhecido, as células eram misturadas numa camada bidimensional, donde resultava que não podiam já ser separadas selectivamente de maneira simples. Isso significa que o sistema de ensaio não podia ser usado novamente.

Em especial devido ao funcionamento instável verificado e o seu modo de reacção não “in vivo” dos sistemas de ensaio conhecidos, foi também já proposto aplicar substâncias, depois de uma metabolização prévia numa mistura de enzimas, a cada tipo de células, para estudo de uma influência.

Mas, neste sistema de ensaio, há de novo o inconveniente de apenas poder abranger-se uma parte dos metabolitos existentes “in vivo”, visto que uma metabolização completa está ligada a um sistema celular intacto.

Substâncias terapeuticamente activas ou tóxicas possíveis mantêm-se deste modo não reveladas, visto que não podem de todo produzir-se. É aqui particularmente inconveniente o facto de não poderem desta maneira avaliar-se potenciais carcinogéneos ou citostáticos.

Um estudo das interacções entre diferentes tipos de células, em especial entre hepatócitos e outros tipos de células, em co-cultura, de acordo com a alínea 4, só teria sentido quando os hepatócitos estivessem em condições de manter uma função estável na cultura. Mas não é esse o caso, nos processos conhecidos.

A presente invenção tem portanto como objectivo proporcionar um processo para a cultura de um tipo de células em co-cultura, no qual podem conseguir-se, ao longo de um longo intervalo de tempo, pelo menos aproximadamente, condições "in vivo", para o estudo desse tipo de células.

De acordo com a invenção, este problema é resolvido por meio de uma cultura de células hepáticas, num suporte, dispondo-se sobre as células hepáticas uma camada de matriz e por cima desta uma segunda camada, do tipo de células a estudar.

De acordo com a invenção, os problemas atrás apontados são resolvidos numa espécie de "técnica de cultura de sanduíche", para hepatócitos, com uma cultura do segundo tipo de células a estudar, por cima desta estrutura, num sistema de cultura tridimensional.

Uma das vantagens da forma do processo de co-cultura de acordo com a invenção consiste em que, deste modo, é mantida uma ligação polarizada dos hepatócitos.

Como normalmente um empilhamento deste género das células, ou uma tal densidade de células, muito rapidamente conduziria a uma carência de oxigénio das células hepáticas colocadas por baixo, num aperfeiçoamento da invenção, muito vantajoso e não evidente, propõe-se que se coloque sobre o suporte oxigénio, na forma de uma oxigenação de membrana, para as células hepáticas.

Consegue-se deste modo a denominada oxigenação de membrana, se o suporte for formado de maneira apropriada e as células hepáticas forem alimentadas com oxigénio suficiente.

Na prática estamos perante uma combinação de uma técnica tripla que

possibilita utilizar as vantagens funcionais de uma técnica de cultura de células hepáticas, em sanduíche, para a preparação de produtos celulares hepáticos e a sua acção imediata sobre qualquer tipo de célula co-cultivada, por cima das mesmas, e inversamente.

Portanto, o processo de acordo com a invenção é constituído por três técnicas em parte conhecidas, designadamente uma oxigenação de membrana através de um suporte, um processo em sanduíche para a cultura de células hepáticas e um novo processo de co-cultura nesta forma.

Por meio deste processo eliminam-se os problemas da oxigenação, obtém-se uma cultura estável de células hepáticas e, ao mesmo tempo, pode fazer-se uma cultura de um tipo de células, por meio do qual podemos investigar efeitos que são produzidos por exemplo pelas células hepáticas e a sua capacidade de metabolização.

Em contraste com os sistemas de ensaio conhecidos, em especial os sistemas de co-cultura conhecidos, temos agora, de acordo com a invenção, um sistema de ensaio funcional e estável, no qual podem produzir-se, durante um período de tempo de várias semanas, metabólitos e estudar a sua acção. O mesmo se aplica também às interacções celulares. Pela primeira vez é deste modo possível fazer investigações de toxicidade a médio e a longo prazo.

Como, numa disposição das células hepáticas e do segundo tipo de células a estudar, umas sobre as outras, a sua preparação pode fazer-se, por exemplo, por uma camada de matriz, pode também, se for necessário, separar de novo selectivamente os dois tipos de células um do outro. Isso pode fazer-se por adição de uma enzima ao tipo de célula cultivado situado por cima. Verificou-se que, por exemplo, a

tripsina é uma enzima apropriada para a separação das células.

A estabilidade funcional a longo prazo das células hepáticas e a possibilidade de separação de um tipo de células, com manutenção das células hepáticas imobilizadas no sistema de sanduíche, possibilita também a reutilização do sistema de ensaio.

Assim, por exemplo, pode fazer-se uma outra cultura de um tipo de células a ensaiar, depois da lavagem do sistema. Isto é particularmente importante, visto que as células humanas, por exemplo as células humanas hepáticas, não podem obter-se de maneira ilimitada.

Uma outra vantagem muito importante do processo de acordo com a invenção consiste também na possibilidade de utilizar hepatócitos humanos, que desse modo conseguem uma muito alta relevância, relativamente aos seus resultados em pessoas, o que é na realidade o objectivo de todos os estudos farmacêuticos e toxicológicos relativos ao homem.

Há também uma grande relevância relativamente aos processos que utilizam misturas de enzimas, visto que estamos na presença, de acordo com a invenção, de um sistema intacto de células, podendo portanto ser ensaiada a totalidade de todos os metabolitos. Os processos conhecidos de co-cultura têm aqui apenas uma relevância muito reduzida para as investigações a médio e longo prazo, visto que as células hepáticas nesses sistemas conhecidos perdem as enzimas metabólicas muito rapidamente.

Descreve-se a seguir com mais pormenor um exemplo de realização do processo de acordo com a invenção.

Representa-se neste caso um processo para a cultura de um tipo de célula no

processo de co-cultura, com tipos de células dispostos uns sobre os outros.

Para uma cultura, em primeiro lugar reveste-se, como suporte, uma membrana (1) pelo menos permeável aos gases, com uma matriz (2). Como membrana permeável aos gases (1), pode utilizar-se, por exemplo, um suporte constituído por um material provido de poros ou furos, com dimensões apropriadas, através dos quais pode conduzir-se ou, respectivamente, difundir-se o oxigénio. Para isso, são apropriados, por exemplo, discos de metal sinterizado, nos quais se introduz oxigénio proveniente de uma fonte de oxigénio, em canais ou furos no interior do disco, a partir dos quais o oxigénio se transfere, através de furos correspondentes, ou poros, para a superfície exterior da membrana (1). São também apropriados, para se usar como membrana (1), materiais plásticos porosos ou celulose.

Como matriz (2), pode por exemplo utilizar-se uma camada que contenha proteínas, como por exemplo colagénio. Nesse caso, podem adicionar-se, se for necessário, eventualmente outros componentes, como por exemplo glicosaminoglicano ou glicoproteína. Tais componentes exercem funções indutivas nos hepatócitos. Os hepatócitos, isto é, as células hepáticas (3), são polarizados, embebidos na ou sobre a matriz (2).

Como tipo de células para a co-cultura com os hepatócitos, podem usar-se, por exemplo células V 79 ou linfócitos. Estas células são vantajosas em especial para ensaios de mutagenicidade.

A matriz (2) serve também para melhorar a adesão das células hepáticas (3). Eventualmente, poderão colocar-se as células hepáticas (3) também directamente na membrana (1), sem a matriz (2) situada intermediariamente, se esta membrana

permitir uma aderência das células hepáticas, por exemplo folhas de poliuretano, polipropileno ou membranas orgânicas, como por exemplo tecido conjuntivo humano ou animal.

As células hepáticas (3) podem, de uma maneira conhecida, por meio da digestão do colagénio da estrutura de tecido conjuntivo, ser isoladas de um fígado e depois lavadas.

Depois de uma colocação das células hepáticas (3) na primeira camada de matriz (2), após cerca de 30 minutos a 1 hora, no caso da utilização do colagénio como estrutura basal de aderência, pode iniciar-se a aplicação de uma segunda camada de matriz (4) sobre as células hepáticas (3). A segunda camada de matriz (4) serve para a fixação das células hepáticas (3) na sua membrana de células situada superiormente nessa estrutura. Tal como para a primeira camada de matriz (2), podem misturar-se eventualmente outras substâncias da segunda camada da matriz (4).

Depois da fixação, com êxito, da segunda camada de matriz (4) na camada superior, pode aplicar-se por cima da mesma uma segunda qualquer, ou também várias espécies de células (5).

Em seguida, coloca-se o meio de cultura ou, respectivamente meio nutritivo (6), numa camada sobre a camada (5) de células a estudar, superior. No caso de tipos de células (5) determinadas, responsáveis dos dois lados pela fixação, pode prever-se uma aplicação adicional de uma terceira camada de matriz sobre o tipo de células (5) a estudar. Isso está indicado na figura por uma linha a tracejado (7). Também neste caso, a camada do meio de cultura ou nutritivo (6) representa o fecho superior por cima da terceira camada de matriz (7). Em geral, prevê-se uma terceira camada de

matriz (7) quando, por exemplo, as células (5) a estudar, superiores, são também células hepáticas.

Com o processo representado, é possível uma co-cultura de células hepáticas (3) com uma qualquer segunda espécie de células (5) e de facto mantendo-se um fenótipo de células hepáticas, estável a longo prazo.

Como a alimentação das células hepáticas (3) com oxigénio é garantida, por meio da oxigenação da membrana, pode cultivar-se cada uma das outras espécies quaisquer de células, da maneira tradicional, na base da segunda camada superior de colagénio (4). A alimentação do tipo de células (5) a estudar faz-se então a partir de cima, através do meio de cultura ou nutritivo (6).

Com o processo de acordo com o exemplo de realização, são possíveis ensaios, por exemplo de toxicidade de fármacos, visto que podem combinar-se directamente células de órgãos específicos, com toxicidade potencial, com um sistema metabólico humano. Isso permite portanto a possibilidade de um processo de "screening", isto é, uma pesquisa sucessiva de várias substâncias.

Podem igualmente estudar-se com este processo produtos do metabolismo humano que não podem obter-se nas experiências com animais, bem como os mais diversos outros sistemas de células. Além disso, há a possibilidade de uma localização exacta de acções tóxicas de acordo com o sistema de células.

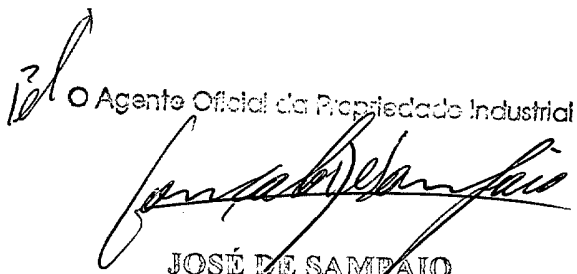
Se necessário, o processo pode também incluir-se numa circulação de meios de cultura dinâmica.

Em vez da aplicação do segundo tipo de células (5), isto é, o tipo de células a estudar na sua influência pelos metabolitos, na camada de matriz (4) voltada para o meio de cultura, pode este segundo tipo de células (5) também ser colocado num

suporte separado (não representado). Este suporte é então, juntamente com as células nele dispostas, lavado com o meio rico em metabolitos proveniente do sistema de células hepáticas. É então possível uma aproximação do segundo suporte do segundo tipo de células (5) de modo que fique um intervalo, com meio de cultura, entre os dois sistemas.

Em vez de uma membrana permeável aos gases (1), pode usar-se como suporte uma simples placa não permeável. Para uma alimentação suficiente de oxigénio seria aliás então necessário efectuar o estudo das células num incubador, no qual possa elevar-se ou ajustar-se a pressão parcial do oxigénio de acordo com a densidade de células, de modo que as células hepáticas sejam suficientemente alimentadas com oxigénio. Na prática, no entanto, em geral, por razões de simplicidade de facilidade de realização, utiliza-se uma membrana permeável aos gases.

Lisboa, 8 de Junho de 2000


O Agente Oficial da Propriedade Industrial
JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.
Rua do Salitre, 195, r/c-Drt.
1250 LISBOA

Reivindicações

1. Processo para a cultura de um tipo de células em co-cultura com células hepáticas, caracterizado por se cultivar uma cultura de células hepáticas (3) num suporte (1), dispondo-se sobre as células hepáticas (3) uma camada de matriz (4) e sobre a mesma um segundo tipo de células (5) a estudar.
2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se colocar sobre o suporte (1) oxigénio, na forma de uma oxigenação por membrana, para as células hepáticas (3).
3. Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado por, entre as células hepáticas (3) e o suporte (1), se dispor uma primeira camada de matriz (2) para a fixação das células hepáticas (3).
4. Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizado por se colocar sobre as segundas células (5), dispostas sobre as células hepáticas (3), um meio de cultura ou meio nutritivo (6).
5. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por, para o segundo tipo de células (5), ser disposta uma terceira camada de matriz (7), sobre a qual se coloca o meio de cultura ou meio nutritivo (6).
6. Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5, caracterizado por o segundo tipo de células (5) ser colocado num segundo suporte próprio, estabelecendo-se um intervalo com meio de cultura ou meio nutritivo (6) entre os dois tipos de células (3, 5).
7. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser realizado num incubador com uma pressão parcial elevada do oxigénio.
8. Utilização de um processo de acordo com as reivindicações 1 a 7, para

verificação de toxicidade de substâncias a estudar.

Lisboa, 8 de Junho de 2000



C. Agente Oficial da Propriedade Industrial



JOSÉ DE SAMPAIO

A.O.P.L.

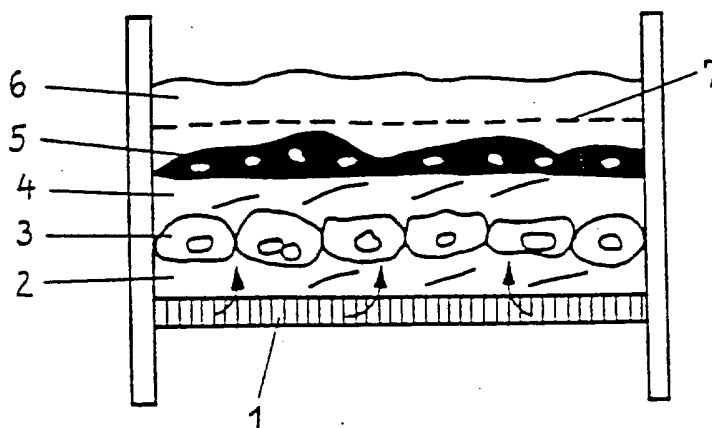
Rua do Saêiro, 195, r/c-Drt.

1250 LISBOA

Resumo

“Processo para a cultura de um tipo de células em co-cultura com células hepáticas”

Num processo para a cultura de um tipo de células, em co-cultura, realiza-se uma cultura de células hepáticas (3), num suporte (1), em sanduíche, entre as quais ou sobre as quais se coloca um segundo tipo de células (5) a investigar.



Lisboa, 8 de Junho de 2000

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

JOSÉ DE SANTAIO
A.O.P.I.
Rua do Solteiro, 195, r/c-Drt.
1250 LISBOA

288

1 / 1

