



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

(21) **PI0706070-0 A2**

(22) Data de Depósito: 26/06/2007
(43) Data da Publicação: 22/03/2011
(RPI 2098)



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

(54) Título: **MÉTODO DE CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

(57) Resumo: METODO DE CULTIVO DE CELULAS-TRONCO MESENQUIMAIS. Essa invenção é direcionada a métodos de expandir células-tronco mesenquimais ex vivo.

(30) Prioridade Unionista: 26/06/2006 US 60/805.801

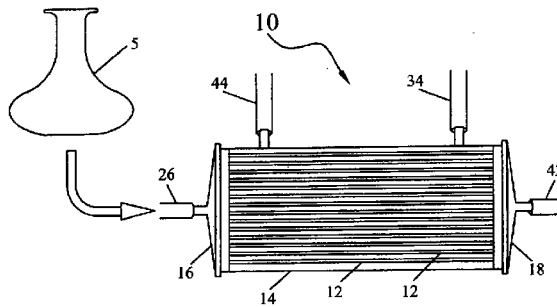
(73) Titular(es): Gambro Bct, Inc.

(72) Inventor(es): Glen Delbert Antwiler

(74) Procurador(es): ORLANDO DE SOUZA

(86) Pedido Internacional: PCT US2007072125 de 26/06/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/002914 de 03/01/2008



MÉTODO DE CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**REINVIDICAÇÃO DA PRIORIDADE**

Esse pedido reivindica a prioridade do pedido de patente provisório U.S de nº 60/805.801 depositado em 26 de
5 junho de 2006.

FUNDAMENTO

As células-tronco humanas, as quais têm sido
expandidas em cultura de uma pequena quantidade de doadores
de células, podem ser usadas para reparar ou substituir
10 tecidos danificados ou defeituosos e têm uma ampla
aplicação clínica para tratamento de uma ampla faixa de
doenças. Os recentes avanços na área da medicina
regenerativa demonstram que as células-tronco têm
propriedades únicas tais como a capacidade de auto-renovar,
15 a capacidade de manter o estado não especializado, e a
capacidade de se diferenciar em células especializadas sob
condições particulares.

Como um componente importante da medicina
regenerativa, o biorreator ou sistema de expansão de célula
20 exerce um papel importante em fornecer ambientes otimizados
para crescimento e expansão da célula. O biorreator fornece
nutrientes às células e remoção de metabólitos, assim como
o fornecimento de um ambiente físico-químico condutivo para
crescimento da célula em um sistema fechado, estéril.

25 Muitos tipos de biorreatores estão atualmente
disponíveis. Dois dos mais comuns incluem biorreatores de
placa plana e biorreatores de fibra oca. Os biorreatores de
placa plana permitem que células cresçam em superfícies
planas grandes, enquanto os biorreatores de fibra oca
30 permitirem que células cresçam no interior ou na parte

externa das fibras ocas.

A sabedoria convencional na área de crescimento e replicação de célula-tronco tem sustentado que em um biorreator ou outro sistema de expansão de célula *in vivo*,
5 as células aderentes tais como células-tronco mesênquimais (MSCs) replicam mais rapidamente quando são envolvidas próximas por outras MSCs, e conseqüentemente um número elevado de MSCs devem inicialmente ser carregadas em um sistema de expansão de célula. A sabedoria convencional
10 também tem sustentado que as melhor MSCs para expansão em um biorreator são aquelas células as quais tem sido altamente purificadas ou separadas de outros tipos de célula contaminantes antes de ser expandidas em um biorreator. O método desta invenção ensina aquele
15 surpreendentemente, esse não é o caso.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1 é uma vista esquemática de um biorreator o qual pode ser usado nessa invenção.

Figura 2 é um gráfico que compara o crescimento das
20 células-tronco mesênquimais que têm níveis diferentes de pureza 7 dias após ressemear.

Figura 3 é um gráfico que compara o crescimento das células-tronco mesênquimais que têm níveis diferentes de pureza 14 dias após ressemear.

Figura 4 é um outro gráfico que compara o crescimento
25 das células-tronco mesênquimais que têm níveis diferentes de pureza.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Esta invenção é direcionada a um método de expandir
30 células-tronco mesênquimais ex vivo incluindo as etapas de

implantar um conjunto de células que contêm as células-tronco mesênquimais em um substrato de modo que uma baixa densidade de células-tronco mesênquimais adiram ao substrato; expandir as células-tronco mesênquimais aderidas no substrato; remover as células-tronco mesênquimais expandidas do substrato; e ressemeiar as células-tronco mesênquimais no mesmo substrato ou em diferente.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Esta invenção se refere aos métodos de implantar e de expandir MSCs em um sistema de cultura de célula.

Como discutido acima, um número de configurações do biorreator existe para cultivar células dependentes de ancoragem tais como MSCs, e esta invenção não é dependente de nenhuma configuração particular.

Entretanto, mas como um exemplo, não significando para ser limitativo, é um biorreator de fibra oca mostrado na figura. 1. Um módulo ou biorreator de expansão de célula ou o qual pode ser usado na presente invenção são produzidos de um conjunto de membranas de fibra oca incluídas dentro de um substrato 14. O conjunto de fibras ocas é referido coletivamente como uma membrana. O alojamento ou módulo 14 pode ser cilíndrico em forma e pode ser produzido de qualquer tipo de material polimérico biocompatível.

Cada extremidade do módulo 14 é fechada com tampas ou cabeças na extremidade 16, 18. As tampas da extremidade 16, 18 podem ser produzidas de qualquer material apropriado tal como policarbonato contanto que o material seja biocompatível com as células a ser crescidas no biorreator.

Pode existir pelo menos quatro portas dentro e fora do

módulo. Duas portas fluidamente conectam-se ao espaço extracapilar (espaço EC), uma porta 34 para o ingresso do meio extracapilar fresco no espaço que cerca as fibras ocas e uma porta 44 para saída do meio extracapilar gasto do 5 módulo. Duas portas também fluidamente conectam-se ao espaço intracapilar (espaço IC), uma porta 26 para o ingresso do meio intracapilar fresco no lúmen das fibras ocas assim como para a introdução das células a ser expandidas, e uma porta 42 para saída do meio intracapilar 10 gasto e remoção de células expandidas do biorreator.

As células a ser expandidas no biorreator podem ser fluídas no espaço IC ou no espaço EC. O biorreator pode ser carregado com as células usando uma seringa ou as células podem ser distribuídas nos espaços IC ou EC diretamente de 15 um separador de célula. As células podem também ser introduzidas no módulo ou biorreator de crescimento de uma bolsa ou frasco de entrada de célula (mostrado como elemento 5) o qual pode ser estéril acoplado ao biorreator.

Como discutido acima, acredita-se que o número de 20 células semeadas inicialmente em um sistema de expansão de célula é um fator importante em como rapidamente as células expandem e alcançam a confluência em um sistema de expansão de célula tal como esse descrito acima. Entretanto, exemplo 1 abaixo mostra que de fato, MSCs não têm de ser envolvidas 25 próximas por outras MSCs para obter o crescimento e expansão ótimos.

Exemplo 1

MSCs foram semeadas inicialmente em frascos em concentrações de 5, 50, 500 e 5000 células/cm². O tempo (em 30 horas) em que as células dobraram foi medido. Como mostrado

na tabela 1 abaixo, o tempo que levou para dobrar médio para células em uma concentração inicial de 5 células/cm² é cerca de 35 horas. As células em uma concentração mais elevada em mil vezes levou cerca 123 horas para dobro.

5 Estes dados sugerem que as células semeadas inicialmente em densidades mais baixas dobram mais rapidamente do que as células semeadas inicialmente em umas densidades mais elevadas. Uma densidade mais baixa é definida como entre cerca de 1-100 células/cm² em um substrato, incluindo entre
10 cerca de 5-50 células/cm² em um substrato.

Tabela 1

Densidade de semeadura de MSCs/cm ²	Tempo de duplicação (h)
5000	123
500	56
50	42
5	35

Acredita-se que outro fator a ser importante na expansão de células mesênquimais, é a pureza das células inicialmente carregadas ou semeadas em um sistema de
15 expansão da célula.

Exemplo 2

Para testar a teoria que para assegurar a expansão máxima de MSCs, MSCs devem ser purificadas de outras células contaminantes, um experimento de quatro vias foi
20 executado. Para os propósitos desse e de outros exemplos, um procedimento de purificação significa quaisquer procedimentos adicionais executados para remover substancialmente todas as células contaminantes de um conjunto de células que contêm MSCs. O conjunto de células

poderia ser células da medula óssea, do sangue periférico, do cordão umbilical, embrionária ou qualquer outro conjunto de células onde MSCs reside. Células não purificadas significam qualquer das células acima não submetidas a um
5 procedimento de purificação.

Para cada via, após a etapa de purificação e fracionamento (se executado) as células foram contadas. O mesmo número de células purificadas (ou não) de cada via foi plaqueado. As células foram crescidas até cerca de 1×10^6 células fossem obtidas (confluência para os propósito
10 deste exemplo). Confluência é definida como o estado em que as células expandiram de modo que elas cubram a superfície disponível inteira do substrato em que elas estão crescendo.

15 Para cada via, dois conjuntos de experimentos foram feitos, um conjunto envolveu passar ou ressemeiar as células a cada 7 dias, e o outro conjunto envolveu passar ou ressemeiar as células a cada 14 dias. Quando as células alcançaram a confluência, os experimentos foram parados.

20 Na via 1, cerca de 50 mL de aspirado da medula óssea foram removidos de um doador e 1 mL foi diretamente plaqueado em um frasco em T de 25 cm² (designado como BM nas figuras 2 e 3). Nenhuma etapa de purificação ou fracionamento foi executada. A área de superfície de um
25 frasco em T de 25 cm² se aproxima da área de superfície de um biorreator de fibra oca de 1,6 m².

Na via 2, 10 mL dos 50 mL do aspirado da medula óssea coletado da via 1 foram purificados para coletar a fração de célula mononuclear (MNC) (onde as células-tronco são
30 encontradas) usando purificação em gradiente padrão de

Ficoll (designado como Ficoll nas figuras 2 e 3). A fração foi plaqueada em frascos em T de 25 cm².

A via 3 envolveu elutriar MSCs dos 40 mL restantes do aspirado da medula óssea coletado na via 1. MSCs foram desavolumados de células vermelhadas do sangue e elutriados usando o sistema Elutra (disponível de Gambro BCT, de Inc., Lakewood, CO, EUA) (designados como Ro40 Debulk nas figuras 2 e 3).

Na via 4, a fração não plaqueada restante da via 3 foi submetida a um procedimento de lise para remover quaisquer células vermelhas do sangue contaminantes restantes (designadas como Ro40 lise nas figuras 2 e 3).

Os gráficos representativos são mostrados nas figuras 2 e 3. Como pode ser visto, as células-tronco mesênquimais foram ressemeadas a cada 7 dias (figura 2) obteve confluência em uma taxa mais rápida do que as células que foram ressemeadas a cada 14 dias (figura 3). Surpreendentemente, as células que receberam menos quantidade de manipulação (diretamente da medula óssea plaqueada contendo células contaminantes) tiveram o crescimento mais rápido. As células que receberam a maior manipulação, e assumiram então ter a maior pureza, (MSCs elutriados com quaisquer células vermelhas do sangue contaminantes lisadas) tiveram o crescimento mais lento.

Estas revelações sugerem também que essas MSCs que foram ressemeadas antes da confluência cresceram pelo menos tão rápido quanto MSCs que foram semeadas inicialmente após a coleta. Essa revelação pode implicar em que o processo de ressemeadura não tem nenhum efeito adverso no crescimento de MSC em um biorreator, e que reusando (ressemeando) a

mesma superfície as células foram semeadas inicialmente parecendo não ter nenhum efeito adverso no crescimento das células. Entretanto, as células podiam ser ressemeadas em um substrato diferente também.

5 É, portanto, desejável não crescer MSCs para confluência. As células devem ser colhidas bem antes que um estado confluyente seja obtido. O crescimento de células suficientes para fornecer uma dose terapêutica suficiente de MSCs seria obtido rapidamente.

10 Exemplo 3

Em um outro exemplo, um protocolo padrão de elutriação tal como aquele descrito no pedido de patente US 11/131.063 foi usado para enriquecer subconjuntos de células-tronco da medula óssea para determinar como as células que foram purificadas cresceriam em comparação às células que não foram purificadas de células contaminantes.

Seis frações elutriadas de medula óssea contendo MSCs substancialmente purificadas foram crescidas para confluência. Os meios substancialmente purificados que a maioria das células em particular fração elutriada são o mesmo tipo da célula. Essas frações elutriadas são mostradas como F1-F6 na figura 4. Uma amostra de 50 mL da medula óssea foi também purificada usando o procedimento de purificação geralmente usado de um gradiente de Ficoll para comparação (mostrada como Ficoll na figura 4). Rotor desligado 40 (mostrado como Ro40 na figura 4) significa que após o plasma, plaquetas e células vermelhas do sangue foram removidas da amostra de medula óssea de 50 ml inicial, o rotor foi desligado e todas as células restantes na câmara de elutriação de 40 mL foram coletadas. Este

procedimento não elui frações ou subconjuntos individuais de células.

A figura 4 compara o tempo em dias para as células das frações elutriadas individuais assim como as células purificadas ficoll e as células coletadas com o rotor desligado para expandir 1×10^8 células. Como pode ser visto, F1-F6 contendo as células mais substancialmente purificadas cresceram mais lentamente, enquanto células menos purificadas (rotor desligado ou Ro40) cresceram mais rapidamente. Isto corrobora as revelações no exemplo 2 acima, que células que são menos purificadas, crescem mais rapidamente.

Exemplo 4

Como discutido acima, acredita-se que a pureza de MSCs a ser expandida é para efetuar como rapidamente as células se expandem em cultura.

O exemplo 4 compara o alfa (α), ou tempo em dias que leva para células dobrarem, de MSCs não purificadas em 50 ml de medula óssea que foi semeada diretamente em um biorreator de fibra oca, com o MSCs que foram pré-selecionadas antes de ser semeadas no biorreator. Semeadura direta significa que a medula óssea retirada de um paciente foi colocada diretamente em um biorreator sem remover nenhuma célula contaminante tais como plaquetas e células vermelhas do sangue. Cavidades ósseas e outro corpo não celular podem ser removidos. Os meios pré-selecionados que 50 ml de medula óssea foram plaqueados inicialmente em um frasco T-75 e as MSCs contidas na mesma foram deixadas se ligar ao frasco e crescer para confluência antes de ser ressemeadas em um biorreator de fibra oca. A pré-seleção

assegura-se de que todas as células a ser expandidas no biorreator sejam MSCs puro. Dois tipos de membranas de fibra oca, uma de poliuretano termoplástico a 0,5% vendido sob a marca registrada Desmopan® (disponível de Bayer MaterialScience AG, DE) e Polyflux® (uma mistura de poliamida, poliariletersulfona e polivinilpirrolidona) (disponível de Gambro Dialysatoren, gmbH, Hechingen, DE) foram testadas. Ambas Desmopan e Polyflux são membranas sintéticas.

10 Tabela 2

	Biorreator semeado direto	Biorreator com MSCs pré- selecionadas
	α	α
Desmopan a 0,5%	17,3	26,7
Polyflux	16,8	23,7

Como é visto da tabela 2 acima, MSCs que foram semeadas diretamente em um biorreator com outras células contaminantes na medula óssea dobraram em uma taxa mais rápida (levou menos dias para dobrar) do que MSCs que foram purificadas primeiro antes de ser expandidas em um biorreator. Isto é verdadeiro para ambos os tipos de membranas sintéticas.

Como mostrado nos exemplos acima, para conseguir uma expansão mais rápida de MSC em um sistema de expansão de célula, as células não necessitam ser purificadas de outras células contaminantes. MSCs deve também ser ressemeadas freqüentemente e não devem ser deixadas alcançar a confluência antes de ser ressemeadas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de expandir células-tronco mesênquimais ex vivo, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

5 a) semear um conjunto de células contendo as células-tronco mesênquimais em um substrato de modo que uma baixa densidade de células-tronco mesênquimais adiram ao substrato;

b) expandir as células-tronco mesênquimais aderidas no substrato;

c) remover as células-tronco mesênquimais expandidas do substrato;

d) ressemear as células-tronco mesênquimais removidas no mesmo substrato ou diferente; e

15 e) repetir etapas b)-d) até o número desejável de células-tronco mesênquimais expandidas ter sido alcançado.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a baixa densidade das células-tronco mesênquimais está entre cerca de 1 a 100 células-tronco mesênquimais/cm².

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a baixa densidade das células-tronco mesênquimais está entre cerca de 5 a 50 células-tronco mesênquimais/cm².

25 4. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a baixa densidade das células-tronco mesênquimais ainda compreende uma densidade de cerca de 5 células-tronco mesênquimais/cm².

30 5. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a baixa densidade das

células-tronco mesênquimais ainda compreende uma densidade de cerca de 50 células-tronco mesênquimais/cm².

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa de ressemar as
5 células-tronco mesênquimais ainda inclui ressemar as células-tronco mesênquimais antes que elas alcancem a confluência.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa de semear ainda
10 compreende semear o conjunto de células contendo as células-tronco mesênquimais antes de realizar um procedimento de purificação.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa de semear ainda
15 compreende semear células da medula óssea contendo as células-tronco mesênquimais.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa de semear ainda
20 compreende semear células do sangue periférico contendo as células-tronco mesênquimais.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa de semear ainda
compreende semear células do cordão umbilical contendo as células-tronco mesênquimais.

25 11. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa de semear ainda compreende semear células embrionárias contendo as células-tronco mesênquimais.

30 12. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa de semear ainda

compreende semear em uma membrana sintética.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a membrana sintética é membrana Polyflux.

5 14. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a membrana sintética é membrana Desmopan.

15 15. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o método de semear em uma membrana sintética ainda compreende semear em fibras ocas.

16. Método de expandir células-tronco mesênquimais ex vivo, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

15 a) semear um conjunto de células não purificadas contendo as células-tronco mesênquimais em um substrato de modo que células-tronco mesênquimais adiram ao substrato;

b) expandir as células-tronco mesênquimais aderidas no substrato.

20 17. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a etapa de semear ainda compreende semear células da medula óssea não purificadas contendo as células-tronco mesênquimais.

25 18. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a etapa de semear ainda compreende semear células do sangue periférico não purificadas contendo as células-tronco mesênquimais.

30 19. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a etapa de semear ainda compreende semear células do cordão umbilical não purificadas contendo as células-tronco mesênquimais.

20. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a etapa de semear ainda compreende semear células embrionárias não purificadas contendo as células-tronco mesênquimais.

5 21. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a etapa de semear ainda compreende semear em uma membrana sintética.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a membrana sintética é
10 membrana Polyflux.

23. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a membrana sintética é membrana Desmopan.

24. Método, de acordo com a reivindicação 21,
15 caracterizado pelo fato de que o método de semear em uma membrana sintética ainda compreende semear em fibras ocas.

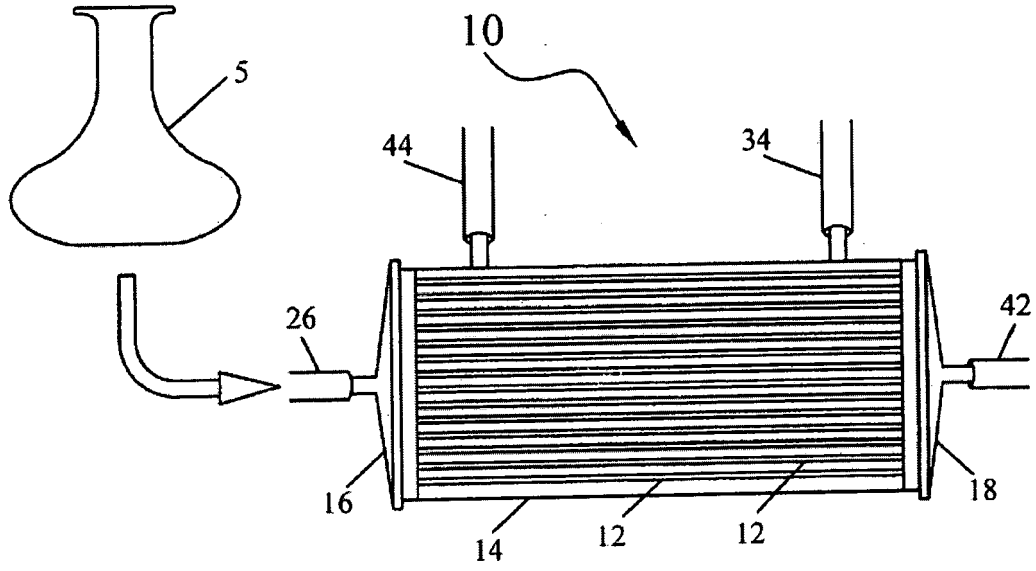


Figura 1

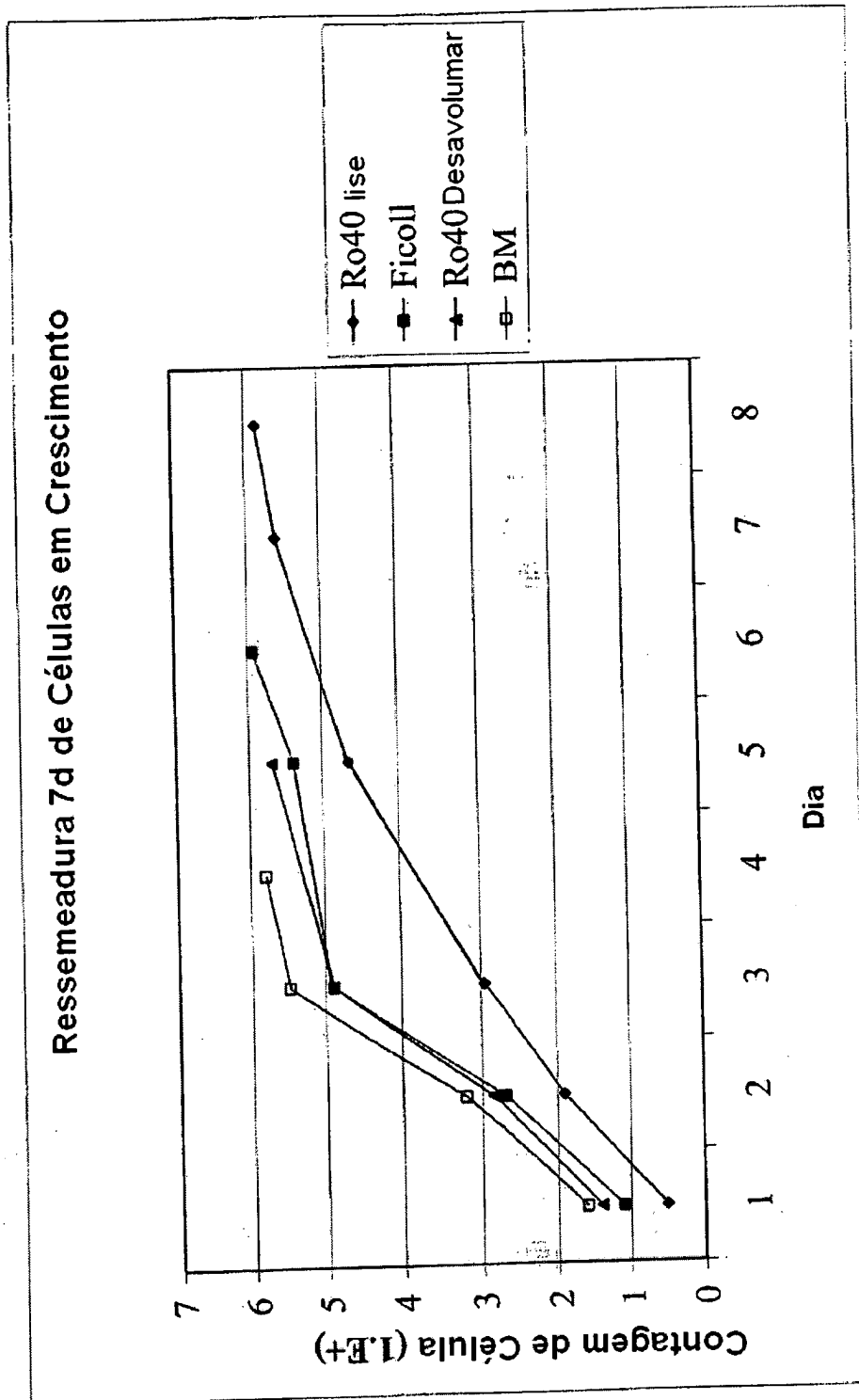


Figura 2

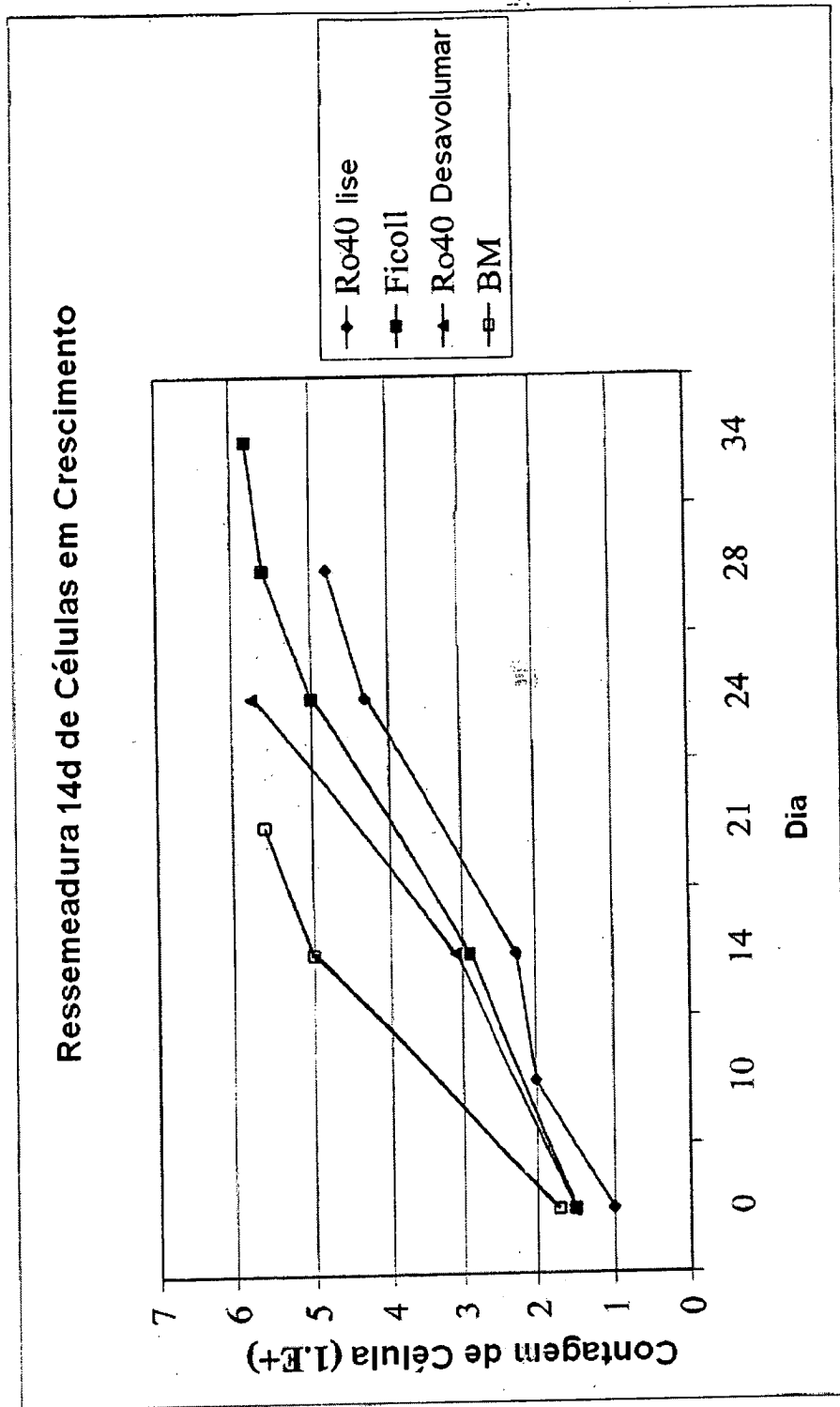


Figura 3

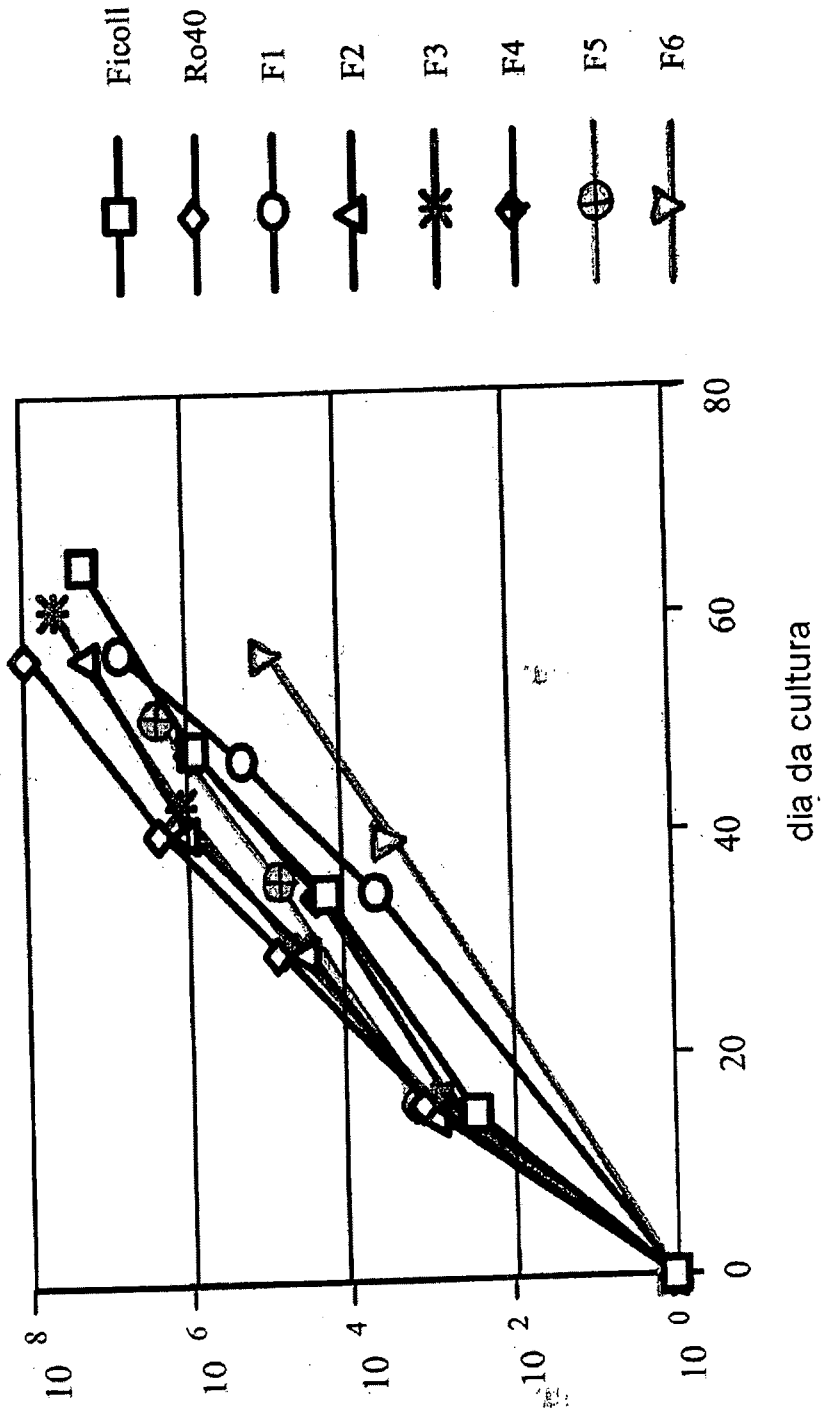


Figura 4

MÉTODO DE CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Essa invenção é direcionada a métodos de expandir células-tronco mesenquimais ex vivo.