

(11) *Número de Publicação:* PT 89357 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)
C12N005/00 A

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) <i>Data de depósito:</i> 1988.12.28	(73) <i>Titular(es):</i> SANOFI, SA. 40, AVENUE GEORGE V 75008 PARIS FR
(30) <i>Prioridade:</i> 1987.12.31 FR 87 18495	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1989.12.29	(72) <i>Inventor(es):</i> CLAIRE LUGASSY FR JEAN-PAUL ESCANDE FR
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 08/94 1994.08.08	(74) <i>Mandatário(s):</i> JORGE BARBOSA PEREIRA DA CRUZ RUA DE VÍTOR CORDON 10-A 3/AND. 1200 LISBOA PT
(54) <i>Epígrafe:</i> TUMORES RECONSTITUÍDOS, PROCESSO DE OBTENÇÃO E EQUIPAMENTO (KIT) DE LABORATÓRIO PARA A SUA EXECUÇÃO	
(57) <i>Resumo:</i>	

[Fig.]

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 89 357

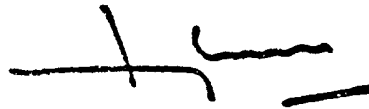
REQUERENTE: SANOFI, francesa, industrial, com sede em 40,
Avenue George V, 75008 Paris, França.

EPÍGRAFE: " TUMORES RECONSTITUÍDOS, PROCESSO DE OBTEN-
ÇÃO E EQUIPAMENTO ("KIT") DE LABORATÓRIO
PARA A SUA EXECUÇÃO "

INVENTORES: Claire Lugassy e Jean-Paul Escande.

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

França, em 31 de Dezembro de 1987, sob o
n.º . 87 18495.



MEMORIA DESCRITIVA

Resumo

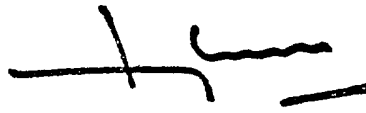
O invento refere-se a tumores reconstituídos, a um processo de obtenção in vitro destes tumores e a um equipamento ("Kit") de laboratório para a execução do processo.

O processo consiste em preparar separadamente por um lado uma população homogênea de célu-

=====

SANOFI

"TUMORES RECONSTITUIDOS, PROCESSO DE OBTENÇÃO E EQUIPAMENTO
("KIT") DE LABORATORIO PARA A SUA EXECUÇÃO"



-2-

las diferenciadas malignas de um determinado tipo provenientes de um explante de um tumor, por outro lado uma população de fibroblastos e em colocar em cultura estas duas populações na presença de colagénio. Os tumores obtidos são constituídos por células diferenciadas malignas de um determinado tipo proveniente de um explante de um tumor, por fibroblastos de um só tipo e por colagénio.

Estes tumores reconstituídos são utilizados no acompanhamento (observação) da evolução in vitro tendo como finalidade estudos clinicos ou ensaios farmacológicos.



-3-

TUMORES RECONSTITUIDOS, PROCESSO DE OBTENÇÃO E ESTOJO DE LABORATORIO PARA A SUA EXECUÇÃO

O presente invento tem como objectivos tumores reconstituídos em três dimensões, um processo de obtenção dos referidos tumores, um estojo de laboratorio para a execução do processo e a sua utilização para estudo clinico delicados ou para ensaios farmacologicos.

A escolha das moléculas que podem servir de principio activo, para um medicamento tendo em vista, o tratamento de celulas diferenciadas malignas no seio de um tecido, é facilitado se se encontrarem à disposição modelos de estudo sobre os quais possa ser conduzido uma experimentação in vitro.

E possivel pôr em cultura fragmentos de explante de um tecido. Um primeiro método de primo-cultura (em seguida método clássico) consiste em colocar os fragmentos a aderir no fundo plano de um frasco, de cultura, imersos num meio de cultura, e em seguida em incubá-los até se verificar uma saída de células.

Um outro método de prima-cultura de explantes de tecidos recentemente descrito (C. LUGASSY O..ENJOLRAS e J.P.ESCANDE,"C.R., Acad. Soc. Paris, T 301, Serie III, no.17, p.779-784, 1985). O método de cultura sob lattice (grade) compacta de cobertura- que se caracteriza pelo facto de ser recobrir os explantes por uma lattice (grade,red) de equivalente de derma obtida fazendo

retrair colagénio por meio de fibroblastos, revelou ser muito eficaz.

Para além da primo-cultura, seja qual for a tecnica executada, após um certo numero de passagens, obtem-se em mono-camada uma população celular homogéneo. Contudo, é evidente que cada população assim obtida tem uma organização sem relação com a de um tecido em que as células diferenciado de um certo tipo estão em contacto, com as células do estroma e, seja como for, entre estas fibroblastos.

De principio pareceu que só um modelo a três dimensões, associando células diferenciadas malignas do tipo submetido à experimentação e fibroblastos, poderia permitir testar, em condições experimentais simulando o contexto encontrado in vivo, as moléculas interessantes para o tratamento de um tecido lesado.

Foi já demonstrado (C.LUGASSY, e J.P. ESCANDE O.R. Acad. Sci. Paris, t.305, Serie III, p. 507-513, 1987) que era possível, pela reconstrução in vitro de melanomas malignos e a partir das células recolhidas na altura de cultura sob lattice (grade, red) de cobertura das explante de melanomas malignos, obter esses modelos a três dimensões.

Estes modelos da tecnica anterior caracterizam-se pelo facto das células diferenciadas estarem aí associadas a fibroblastos provenientes de duas origens diferentes e oriundas precisamente uns do estroma do explante do tecido em primocultura e os outros da propria lattice.



-5-

O requerente demonstrou actualmente que era possível de um modo surpreendente preparar um modelo associando células diferenciadas malignas de um determinado tipo provenientes de um explante de tumor, e fibroblastos de um só tipo.

O invento refere-se, num primeiro aspecto, a um tumor reconstituído em três dimensões constituído por células diferenciadas malignas de um determinado tipo proveniente de um explante de um tumor, por fibroblasto de um só tipo e por colagénio.

As células diferenciadas podem pertencer a qualquer tipo conhecido. Trata-se de um modo preferido, de tipo celulares encontrado, quer na medula, quer na derme e neste caso mais particularmente nos melanócitos. Estas células são malignas. Podem ser provenientes de um tumor primitivo ou de metástases, de preferência de metástases. O invento refere-se nomeadamente a tumores reconstituídos em três dimensões cujas células diferenciadas são os melanócitos provenientes de uma melanoma ou ainda de bastos tumorais.

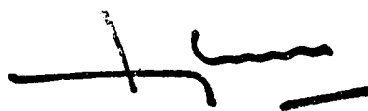
As células de aspecto fibroblástico podem provir de diversas, origens. Os fibroblastos de origem vascular são particularmente bem adaptados. De preferência, utiliza-se fibroblastos preparados a partir de um tumor vascular, e, nomeadamente de um angioma.

De acordo com o invento, é possível construir a partir de células diferenciadas de um determinado tipo, numerosos tumores reconstituídos, cada um deles associando as suas células a um tipo particular de fibroblastos. O conjunto destes tumores reconstituídos pode então permitir, e isto constitui uma vantagem principal do invento, uma análise comparada de inter-relações celulares de que são capazes, as células diferenciadas em relação aos fibroblastos, esta análise é nomeadamente útil para aprender (avaliar) o crescimento dos tumores.

Os tumores reconstituídos de acordo com o invento, constituem actividade biológica que são mantidas em contacto com um numeroso meio de cultura adaptado à cultura e à manutenção das células eucariontas. É conveniente um meio tal como o meio RPMI 1640 (G.E. MOORE et al., J.Am. Med. Assoc. 199, 8(1967) 87-92), eventualmente completado, por exemplo, por um ou por vários ácidos aminados, por soro de vitelo fetal e por um ou vários antibióticos.

O invento refere-se, segundo um outro aspecto, a um processo de obtenção dos tumores reconstituídos de acordo com o invento. Este processo caracteriza-se por se preparar separadamente, por um lado uma população homogênea de células diferenciadas malignas de um determinado tipo e por outro lado uma população de fibroblastos e por se pôr a incubar, em presença de colagénio estas duas populações.

É conveniente ter em conta a simplicidade de execução do processo de acordo com o invento que é notável, quando a população homogênea das células sob



-7-

as quais se quer estudar a patologia, pode ser obtida a partir de uma linhagem dessas células. De um modo geral, partindo de um tumor, as células diferenciadas são preparadas a partir de um explante deste último. Fragmentos deste explante são submetidos a uma primo-cultura de acordo com um dos métodos conhecidos. As células, diferenciadas que saem deste fragmento são recolhidas, após um tratamento com tripsina tal que só se destaquem as células diferenciadas, e são colocadas em cultura. Procede-se então a transplantações sucessivas de modo a despor-se por fim de uma suspensão celular, densa.

Os fibroblastos são preparados a partir da cultura de um explante de um tecido. O explante, recortado em pequenas fragmentos, é colocado em cultura de acordo como método de primo-cultura clássico. Os fibroblastos contidos no explante invadem o frasco em 3 a 6 semanas; pode-se então proceder a transplantações sucessivas, evitando geralmente ultrapassar 15 passagens, de modo a dispor-se por fim de uma suspensão celular densa.

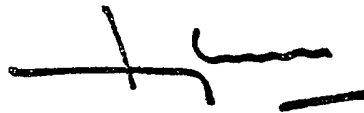
No que se refere às células diferenciadas, é possível partir de uma linhagem pré-estabelecidas. Esta linhagem é colocada em cultura e transplantada de modo a dispor-se por fim de uma suspensão celular densa.

Quer se trate de células diferenciadas ou de fibroblastos, é certamente possível conservar a suspensão celular final de qualquer suspensão celular intermediária sob a forma congelada.

Um meio de cultura que convenha à preparação de populações de células diferenciadas e de fibroblastos é igualmente o meio RPM1, eventualmente completada, nomeadamente por um ou vários ácidos aminados, por soro de vitelofetal e por um ou vários antibióticos.

Colocam-se em presença, sob a forma de suspensão, as células diferenciadas e os fibroblastos. A sua mistura pode conter por unidade de volume $3/4$ de células diferenciadas, e $1/4$ de fibroblastos ou inversamente $1/4$ de células diferenciadas e $3/4$ de fibroblastos.

São possíveis todas as combinações intermediárias. Apenas convém citar que uma das duas populações celulares tenha um efectivo inferior a um terço do da outra população celular. De um modo preferido, coloca-se em presença tantas células diferenciadas, como fibroblastos. O número de células a introduzir depende, por um lado do volume final no qual a mistura celular vai ser posta a incubar após adição de colagénio e, por outro lado, de quantidade de colagénio introduzido. Este volume final é ele mesmo função da medida do recipiente de fundo plano utilizado. A título de exemplo, quando se utiliza uma caixa de Petri de 6 cm de diâmetro, é vantajoso, em presença de 1,5 ml de uma solução de colagénio a 1 mg/ml, para um volume final de 4,7 ml, introduzir globalmente $2 \cdot 10^6$ células sob um volume de 0,5 ml sob a forma de uma mistura pré-formada das duas categorias de células, contendo $4 \cdot 10^6$ células por ml ou por adição de 0,25 ml de uma suspensão de uma categoria de células e de 0,25 ml de uma suspensão da outra categoria de células, contendo cada suspensão $4 \cdot 10^6$ células por ml.



-9-

O colagénio utilizado é obtido a partir de tecidos conjuntivos; os tendões da cauda do rato constituem uma ponte de fácil utilização. Prepara-se uma solução de colagénio ligeiramente acida, sendo o colagénio após extracção e purificação posta em solução, por exemplo, numa solução a 1 para 1.000 (v/v) de ácido acético. A solução de colagénio utilizado pode conter de 0,1 a 5 mg de colagénio por ml. De um modo preferido, a solução contém 1 mg por ml.

A solução de colagenio colocada num recipiente de fundo plano tal como uma caixa de Petri, são acrescentadas, de preferencia, simultâneamente as duas suspensões celulares ou a sua mistura préviamente preparada, um meio nutritivo como um agente de neutralização tal como soda.

A mistura obtida é posta a incubar a uma temperatura adaptada à cultura de células de mamífero e de preferencia a 37°C. Após varios dias, verifica-se a aparição, sob a acção das células que leram a retração do colagenio, de um disco irregular cujas dimensões se estabilizam. Este disco constitui um tumor reconstituído em 3 dimensões de acordo com o invento.

As dimensões deste tumor reconstituído são função de quantidade de colagenio e do numero de células postas em acção capazes de retrair o colagenio. A título de exemplo, quando se utiliza $2 \cdot 10^6$ células sob um volume de 0,5 ml de 1,5 ml de uma solução de colagenio a 1mg/ml numa caixa de Petri com 6 cm de diametro, e na presença de 2 ml de meio RPM1. 1640 completado com 0,25 ml de NaOH e com 0,45 ml de soro de vitelo fetal, obtemse após 4 ou 5

dias de incubação a 37°C, um tumor reconstituído cuja forma evoca a de um disco com contornos irregulares de 5 a 10 cm de diâmetro de e de 0,5 a 2 mm de espessura.

O tumor reconstituído assim obtido caracteriza-se nomeadamente pela sua capacidade de produzir, uma vez transferido para um frasco de cultura e posto a aderir no fundo do frasco, de um modo contínuo, células que se escapam de sua periferia para o conjunto da caixa. Distinguem-se células de aspecto fibroblástico constituindo um tapete e células diferenciadas que se organizam em colônias à superfície deste tapete; estas células provêm tanto umas como as outras das células iniciais produzidas.

Este tumor reconstituído constitui uma entidade biológica de uma grande estabilidade no sentido de conservar a sua organização tissular e a sua coesão e produz em primo-cultura células de duas categorias iniciais. Este fenómeno de emergência celular só cessa quando as referidas células saídas do tumor reconstituído chegam à confluência celular e atapetam de um modo completo o fundo do recipiente. É possível, contudo, relançar este fenómeno de emergência celular transferindo o tumor reconstituído para um outro recipiente novo.

De um modo surpreendentemente, é possível obter, a partir de um tumor reconstituído, obtido a partir de células diferenciadas emergindo de fragmentos de um explante de um tumor colocado em primo-cultura ou pertencendo a uma linhagem celular - o referido tumor reconstituído de primeira geração - um segundo tumor reconstituído apresentando características muito próximas. Do mesmo modo,

a partir deste tumor reconstituído - chamado de segunda geração - é possível obter, um tumor reconstituído apresentando características muito próximas. De um modo geral é possível em definitivo, a partir de um tumor reconstituído do genero de ordem n , obter um tumor reconstituído derivado de geração de ordem $n + 1$ apresentando características pouco dependente das do tumor reconstituído de geração de ordem n .

E suficiente, com efeito, recolher as células saídas de tumor reconstituído inicial e colocá-las em contacto com uma solução de colagenio. O tumor reconstituído derivado é obtido a pós uma incubação de alguns dias. Um tumor reconstituído da ordem $n + 1$, pode tal como foi indicado para os tumores reconstituídos de primeira geração, ser transferido para um meio novo.

Verificou-se, contudo, que um tumor reconstituído da ordem $n + 1$ tiver características vizinhas de um tumor reconstituído da ordem n de onde preciso proveio, quanto mais n for elevado, mais o tumor da ordem $n + 1$ diferirá do tumor reconstituído inicialmente obtido da ordem 1, no entanto nos entido, que de geração em geração os tumores reconstituídos se empabrecem em células de aspecto fibroblástico emergindo em propersão um numero cada vez mais elevado de células diferenciadas, que se tornam incapazes, devido ao numero reduzido de células de aspecto fibroblastico de reconstituir - apoiando-se sobre células de aspecto fibroblastico que aderiram ao fundo do recipiente - colónias.

São feitas as mesmas observações duma transferencia a outra de um determinado tumor reconstituído.

Esta evolução dos tumores reconstituídos de acordo com o invento, de geração em geração ou de transferência em transferência, não constitui contudo um real handicap (desvantagem) para a utilização dos referidos tumores reconstituídos. E com efeito, sempre possível obter um tumor reconstituído de primeira geração a partir das células diferenciadas que emergem de tumor reconstituído qualquer de acordo com o invento. Basta recolher as células e misturá-las de acordo com o processo do invento atrás descrito, em presença de colagénio com uma suspensão de fibroblastos preparados a partir da população inicialmente utilizada para a obtenção em primo-culturado tumor reconstituído de ordem 1.

O invento refere-se, sob um outro aspecto, a um estojo de laboratório adaptado à execução do processo de obtenção de acordo com o invento.

Este estojo é mais especialmente destinado aos laboratórios que dispõem de linhagens tumorais e que desejam testá-las. Apresenta-se sob o aspecto de uma bolsa. Esta bolsa contém material de laboratório e reagentes, que permitem a utilização, tendo como finalidade o invento, de uma suspensão congelada de fibroblastos conservada a -180°C , por exemplo, em azoto líquido e cuja eficácia foi testada. Esta suspensão faz parte integrante do estojo.

De uma maneira preferida, o estojo contém o material e os reagentes em quantidade suficiente para a preparação de 5 a 10 lattices (redes).., Vantajosamente, contém nomeadamente uma solução, de colagenio a 1 mg por ml e soda 0,1M. Pode conter também frascos, de

fundo plano assim como frascos úteis para assegurar a mistura das células diferenciadas e dos fibroblastos em presença de colagénio.

O invento refere-se segundo um outro aspecto, à utilização dos referidos tumores reconstituídos como agentes de estudos clinicos e instrumentos (elementos) de farmacologia, quando se põe nomeadamente o problema do prognóstico de uma patologia que afecte células diferenciadas e o problema da escolha das moléculas que podem servir de principio activo para um medicamento adaptado ao tratamento desta patologia.

Com efeito, de acordo com o invento, é possível, a partir das células diferenciadas malignas, construir em laboratorio num grande numero de tumores reconstituídos, associando a estas celulas quer os fibroblastos sob estroma quer as acompanham in situ, quer os fibroblastos de uma outra origem. Estes tumores reconstituídos constituem então modelos experimentais em tres dimensões que permitem determinar, alongo da sua evolução seguida in vitro, diferentes parâmetros biológicos cuja análise contribui," em função das observações anteriores, para orientar o seu estudo clínico.

Nos tumores reconstituídos de acordo com o invento, as c-elulas malignas têm um comportamento in vitro que se aproxima do seu comportamento in vivo. Estz comportamento caracteriza-se nomeadamente pela aparição dos nódulos de e de nucleos tridimensionais destas células que emergem de um tapete de células fibroblásticas.

Compreende-se que elas constituem os modelos de uma grande utilidade em farmacologia.

E assim que uma molécula pode ser testada quanto à sua acção anti-cancerosa com interesse: a não-formação de nódulos ou de nucleos tridimensionais: ou um abrandamento da sua cinética de formação permite medir a eficacia da molécula testada. Uma tal determinação que não podia ser realizada com o auxilio das linhagens tumorais que serviam de modelo de estudo constitui um progresso importante.

Exemplo 1

Este exemplo descreve a obtenção de três tumores reconstituído a partir de uma linhagem celular de melanocitos provenientes de um melanoma maligno e de fibroblastos de três origens diferentes, assim como a obtenção, a partir destes três melanomas malignos reconstituídos (MMCoR1) de três melanomas malignos de segunda geração (MMCoR2) e em seguida de três melanomas malignos de terceira geração (MMCoR3). Paralelamente, num ensaio testemunha é realizado em condições identicas, mas sem acrescentar fibroblastos. E apresentado uma comparação, das caracterfsticas dos melanomas malignos reconstituídos obtidos.

1- REAGENTES E MATERIAL

a) Colagénio

Extraiu-se de caudas de ratos colagénio do tipo I que foi preparado de acordo com a técnica conhecida (cuja descrição será encontrada em Proc. Naty. Acad. Sci. USA, Vol.76, no.8, 1979, p.1274), sob a forma de uma solução purificada aquosa a 1 por 1.000 (v/v) de ácido acetico contendo 1 mg de colagénio por ml.

b) Meio de Cultura completo

Meio RPM1 1640 (Gibco) adicionado com:

- * 1% de L-glutamina
- * 15% (v/v) finais de soro de vitelo fetal
- * penicilina à razão de 100 unidades por ml
- * estreptomicina à razão de 100 ug por ml

c) Frascos de cultura

Foram utilizados frascos cuja face plana apresenta uma superfície de 25 cm², comercializados pela Societe Flacon.

2- MODO OPERATORIO

A) Obtenção dos Melanomas Malignos Reconstituídos de Primeira Geração

a) Preparação de uma suspensão de melanocitos

Fragmentos de um explante de uma metastase cutânea torácica de um melanoma maligno humano do pescoço são colocados em contacto com uma place plana de um frasco (F1) e cultura no qual foram vertidos 2 ml de meio de cultura completo. O frasco é levado a 37°C. Verifica-se a partir dos fragmentos uma emergência de células. Entre estas células, desde a primeira semana, observam-se algumas células, melanocitárias no meio de células com aspecto fusiforme. Após 5 a 8 dias, a quantidade de meio é levada até 5 ml. O meio é em seguida renovado de 5 em 5 dias.

No fim da quarta semana da incubação, as células de aspecto fusiforme recobrem a referida face plana do frasco com um tapete contínuo na superfície do qual aparecem numerosas ilhotas, de melanocitos. O meio de cultura é então eliminado por inversão do frasco, e a solução de lavagem de HANKS (Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 1949, 71, 196) é acrescentada, e em seguida, após um curto espaço de tempo, eliminada.

A adição de 0,5 ml de uma solução de tripsina a 0,25% (p/v) no frasco permite então, após um contacto interrompido ao fim de 3 minutos pela adição de 5 ml

de meio completo, a separação apenas dos melanocitos, cuja aderência é menos importante que a das células fusiformes.

Com o auxílio de uma pipeta, a suspensão celular é recolhida e centrifugada a 230 g durante 5 minutos. O fundo que é pigmentado é retomado em 10 ml de meio completo. A suspensão obtida é repartida em 2 frascos (F2) à razão (à média) de 5 ml por frasco. Os frascos são postos a incubar 8 dias a 37°C na presença de 5% de CO₂.

As células desta primeira passagem são tripsinizadas, recolhidas e transplantadas. Tal como foi atrás indicado para 2 frascos (F3). Após 8 dias de incubação a 37°C em presença de 5% de CO₂, as células provenientes desta segunda passagem são tripsinizadas.

As 4 suspensões celulares preparadas a partir de 4 frascos (F3) são reagrupados e centrifugados a 230 g durante 5 minutos. O fundo desta última passagem, que é fracamente pigmentada, é colocado em suspensão e levado a incubação para uma terceira passagem.

A saída desta última passagem, as células são recolhidas após tratamento pela tripsina, sendo em seguida centrifugadas. O fundo, que é acrómico, é repostado em suspensão num meio completo tendo em vista uma contagem celular de modo a obter-se uma suspensão M1 contendo 4.10^6 células por ml.

b) Preparação das suspensões de fibroblastos

i) Origem das células

Foram realizadas três biópsias respectivamente a partir:

- * da pele normal de um indivíduo caucasiano com 24 anos de idade (mais abaixo fibroblastos a)
- * da pele normal de um indivíduo negro com 28 anos de idade (mais abaixo fibroblastos b)
- * de um angioma capilar venoso de face numa mulher de 20 anos (mais abaixo fibroblastos c)

ii) Modo Operatório

Cada um dos 3 explantes obtidos na altura das biópsias é tartado da maneira descrita no parágrafo anterior. A confluência celular é obtida para as primo-culturas em 3 a 5 semanas e para a primeira e segunda passagens em 7 a 14 dias. Deve-se notar que é necessario deixar actuar a tripsina pelo menos 10 minutos para obter o desprendimento das fibroblastos em virtude da sua parte aderência.

Em definitivo, cada tipo de fibroblastos é obtido sob a forma de uma suspensão F1 contendo 4.10^6 células por ml.

c) Co-incubação dos melanocitos e dos fibroblastos em presença de colagénio

Colocam-se em presença numa caixa de Petri de 6 cm de diâmetro contendo meio de cultura as suspensões M1 e F1 acrescentando colagénio, sendo os diferentes componentes e ingredientes acrescentado, nas proporções que se seguem:

- solução de colagénio 1,5 ml
- meio de cultura completo 2 ml
- NaOH 0,1M 0,250 ml
- soro de vitela fetal 0,450 ml
- suspensão M1 0,25 ml
- suspensão F1 0,25 ml

Colocam-se pois em incubação 2.10^6 células em presença de 1,5 ml de uma solução de colagénio a 1 mg/ml. Após 2 a 10 dias de retracção a 37°C , forma-se uma lattice (rede) que é reconstituição de um melanoma maligno chamado de primeira geração (melanoma MMcoR1).

B) Obtenção dos Melanomas Malignos Co-Reconstituídos de Segunda Geração e de Terceira geração

Após 8 a 15 dias de incubação a 37°C, o melanoma MMcoR1 é transferido e posto a aderir um frasco contendo meio de cultura completo que se coloca em incubação a 37°C.

O melanoma MMcoR1 dá origem, por migração para fora da sua massa para o conjunto do fundo do frasco, a uma população celular P2, constituída igualmente por células melanocitárias diferenciadas e por células de aspecto fibroblástico. A partir desta população P2, prepara-se uma suspensão S2. Acrescenta-se 0,5 ml de uma solução de tripsina a 0,25% (p/v). Após 5 a 15 minutos de contacto, verifica-se o desprendimento e a individualização do conjunto das células. A suspensão é recolhida por pipetagem e ajustada de modo a conter 4.10^6 células por ml.

Um melanoma maligno de segunda geração (MMcoR2) é então reconstituída acrescentando a 0,50 ml da suspensão S2, 1,5 ml de solução de colagenio em presença de 2 ml de meio de cultura completo adicionado de 0,25 ml de NaOH 0,1 M e de 0,45 ml de soro de vitelo fetal.

De um modo idêntico, a partir da suspensão 53 preparado a partir da população P3, igualmente constituída por células melanocitárias diferenciadas por células de aspecto fibroblastico, a qual dá origem ao melanoma MMcoR2, é reconstituído um melanoma maligno de terceira geração (MMcoR3).

C) Transferência dos Melanomas Malignos reconstituídos

Cada melanoma maligno reconstituído é colocado em cultura até que as células, às quais ele dá origem no frasco, consigam uma confluência devido à sua proliferação. O melanoma é então transferido e colocado num frasco novo contendo meio de cultura completo. A operação é renovada de 4 a 8 em 4 a 8 semanas com função da rapidez do crescimento celular.

D) Reconstituição de Melanomas Malignos de primeira Geração a partir dos três melanomas malignos de Terceira Geração

0,5 ml de uma solução de tripsina a 0,25 (p/v) é vertido no frasco contendo o melanoma MMcoR3 obtido em B. Após um contacto de 5 minutos, a suspensão celular que contém essencialmente melanócitos é retirada depois ajustada para $4 \cdot 10^6$ células por ml. 0,25 ml desta suspensão é então misturada a 0,25 ml de suspensão F1 inicialmente utilizada para a obtenção do melanoma de primeira geração de acordo com o protocolo descrito em 2c.

São assim obtidas três novos melanomas malignos. Cada um apresenta as características do MMcoR1 inicial do qual derivam.

3 - RESULTADOS

Foram obtidos 9 melanomas reconstituídos: 3 de primeira geração (MMcoR1), 3 de segunda geração (MMcoR2) e 3 de terceira geração (MMcoR3).

O Quadro a seguir apresenta a sua origem e a sua filiação:

Células utilizadas	Primeira geração	Segunda geração	Terceira geração
Melanocitos + fibroblastos a	MMcoR1a	MMcoR2a	MMcoR3a
Melanocitos + fibroblastos b	MMcoR1b	MMcoR2b	MMcoR3b
Melanocitos + fibroblastos c	MMcoR1c	MMcoR2c	MMcoR3c

Paralelamente, um ensaio de controlo (testemunha) realizado com as únicos melanocitos sem fibroblastos levou à obtenção de três gerações sucessivas de lattices (redes) de melanocitos pouco retraídos (LM) indicados a seguir respectivamente LM1, LM2 e LM3 que não constituíram tumores reconstituídos no sentido do invento.

Para cada melanoma reconstituído e para cada lattice (rede) LM, anotou-se o seu poder de retracção medindo o seu diâmetro," a sua capacidade de adesão ao fundo do recipiente que o contem e a côr do fundo centrifugado após recolha das células que migram para o meio de cultura a fim de apreciar a pigmentação celular. Foi também realizado um exame microscópico destas células.

Foram feitas as observações que se seguem:

PARA A 1ª. GERAÇÃO

LM1

- Retracção pouco importante: partindo de um gel de 6 cm de diâmetro obtem-se uma lattice (rede) de 3 cm
- aderência nula: a lattice (rede) transferida para um frasco de cultura descola-se com o mínimo movimento
- saída de células: equivale à multiplicação de uma linhagem em passagem
- pigmentação : côr bege muito claro.

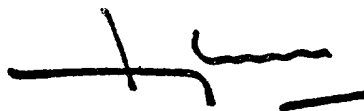


MMcoR1a e MMcoR1b

- A evolução é a mesma para estes 2 melanomas
- retracção: 0,8 cm
- aderência: forte
- saída de células: aparição de colónias visíveis a olho nú de células tumorais e de um tapete de células com aspecto fibroblástico
- pigmentação : nula nos dois casos.

MMcoR1c

- retracção : 1,3 cm
- aderência : superior à de MMcoR1a e MMcoR1b; a recolha da população P2 (cf parágrafo 2B) necessitou que se deixasse agir a solução de tripsina durante 15 minutos.
- saída de células: explosão de nódulos tridimensionais de células tumorais sobre um fundo de células de aspecto fibroblástico
- pigmentação : nula



-25-

PARA A 2ª. GERAÇÃO

(fazendo referência às observações precedentes)

LM2

- Retracção e aderência semelhantes
- pigmentação nula
- saída de células: sempre aspecto de uma linhagem

MMcoR2A e MMcoR2b

- Retracção e aderência um pouco diminuídas
- pigmentação inalterada
- saída de células: diminuição das células de aspecto fibroblastico que persistem sobretudo em redes de lattice (rede). Aspecto progressivamente proximo de uma linhagem em passagem de células tumorais

MMcoR2c

- retracção, aderência e pigmentação inalteradas
- sempre presença de nódulos tridimensionais e de células de aspecto fibroblastico, mas de apaição menos rápida

PARA A 3ª. GERAÇÃO

(fazendo referência às observações precedentes)

LM3

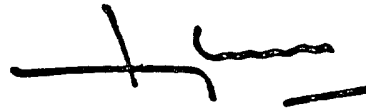
- Evolução semelhante com afrouxamento do crescimento celular

MMcoR3a e MMcoR3b

- retracção (2,2 cm) e aderência diminuídas, aproximando-se das de ACM3
- saída de células: rarefacção das células de aspecto fibroblástico e aparição de um crescimento de tipo de linhagem tumoral

MMcoR3c

- retracção inalterada
- aderência um pouco diminuída
- saída de células um pouco retardada, com colónias visíveis a olho nú de menor tamanho e em menor número. Persistência das células fusiformes cujo crescimento é também retardado.

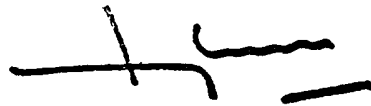


-27-

E importante notar que a partir de cada um dos 3 melanomas malignos reconstituídos de terceira geração (MMcoR3a , MMcoR3b e MMcoR3c) foi possível, re-associando os melanocitos que deles derivaram aos fibroblastos da suspensão F1 inicialmente utilizada, obter um melanoma maligno reconstituído cujas potencialidades são as do melanoma maligno reconstituído de primeira geração (ou seja respectivamente MMcoR1a, MMcoR1b e MMcoR1c).

Exemplo 2

Este exemplo descreve a obtenção de um tumor reconstituído a partir de blastos tumorais provenientes da medula de um doente atingido (sofrendo) por um linfoma de Burkitt.



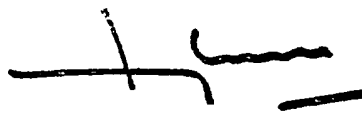
-28-

1- MODO OPERATORIO

Uma suspensão de blastos tumorais foi preparada a partir de células da medula do doente. Após incubação das células da medula num meio de cultura, observou-se, a formação de pequenos núcleos tridimensionais constituídos por blastos tumorais sobre um tapete de células fibroblásticas. Estas células foram recolhidas após tripsinação e colocadas de novo em suspensão em meio completo.

Esta suspensão de blastos tumorais foi co-incubada com uma suspensão de fibroblastos de angioma (fibroblastos do exemplo 1) em presença de colagénio.

O modo operatorio executado, os reagentes e o material utilizados são descritos no exemplo 1.



-29-

2- RESULTADO

Após retracção a 37⁰C, constituiu-se um tumor. Após colocação deste tumor, em cultura observou-se a formação no seu contorno e à distância de núcleos e de nódulos de blastos tumorais aderindo muito fortemente a um tapete de células fusiformes.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1ª.- Tumor reconstituído em três dimensões, caracterizado pelo facto de ser constituído por células diferenciadas malignas de um determinado tipo proveniente de um explante de um tumor, por fibroplastos de um só tipo e por colagénio.

2ª.- Tumor reconstituído de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto das células diferenciadas malignas serem provenientes de uma metástase de melanoma.

3ª.- Tumor reconstituído de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto das células diferenciadas malignas serem provenientes da medula.

4ª.- Tumor reconstituído de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo facto das fibroplastos serem provenientes de um angioma.

5ª.- Processo de obtenção de um tumor reconstituído, caracterizado pelo facto de se preparar separadamente por um lado uma população homogénea de células diferenciadas malignas de um determinado tipo e

por outro lado uma população de fibroblastos, e por se colocarem em cultura, estas duas populações em presença de colagénio.

6ª.- Processo de obtenção de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo facto das células diferenciadas e dos fibroblastos serem provenientes de dois explantes diferentes.

7ª.- Equipamento ("Kit") de laboratório para a execução do processo de obtenção de acordo com uma das reivindicações 5 ou 6, caracterizado pelo facto de ser constituído por uma suspensão de fibroblastos e por uma solução de colagénio.

Lisboa, 28 de Dezembro de 1988



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA