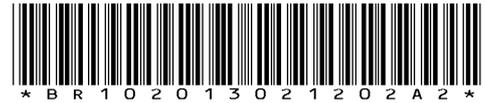




República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) **BR 10 2013 021202-4 A2**



(22) **Data de Depósito:** 20/08/2013

(43) **Data da Publicação:** 28/07/2015  
(RPI 2325)

(54) **Título:** PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MULTIPOTENTES E PROGENITORES, CÉLULAS TRONCO E/OU PROGENITORES, FRAGMENTOS DE TECIDOS DE NNCT E CONCENTRADO DE CÉLULAS TRONCO

(51) **Int.Cl.:** C12N5/02; C12N5/074; C12N5/0775

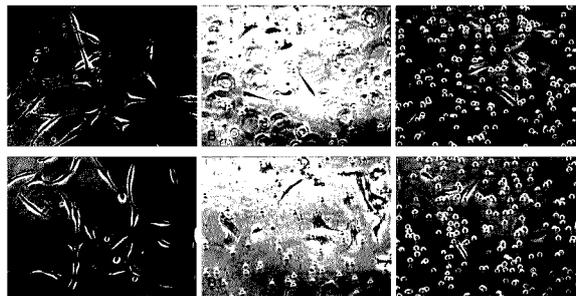
(73) **Titular(es):** CCB - CENTRO DE CRIOGENIA BRASIL LTDA.

(72) **Inventor(es):** ALEXANDRE KERKIS, CARLOS ALEXANDRE AYOUB, NELSON FORESTO LIZIER

(57) **Resumo:** RESUMO

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MULTIPOTENTES E PROGENITORES, CÉLULAS TRONCO E/OU PROGENITORES, FRAGMENTOS DE TECIDOS DE NNCT E CONCENTRADO DE CÉLULAS TRONCO

A presente invenção refere-se a um processo não enzimático de produção de células tronco multipotentes e progenitores a partir do cultivo de nichos das células tronco



PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MULTIPOTENTES E PROGENITORES, CÉLULAS TRONCO E/OU PROGENITORES, FRAGMENTOS DE TECIDOS DE NNCT E CONCENTRADO DE CÉLULAS TRONCO

A presente invenção refere-se, de maneira geral, a um  
5 processo não enzimático de produção de células tronco multipotentes e progenitores a partir do cultivo de nichos das células tronco.

Antecedentes da invenção

Sabe-se que populações de células tronco situam-se em  
10 localizações anatômicas particulares do corpo humano - ou seja, nichos naturais - que garantem sua manutenção, assim como as interações celulares necessárias para que essas células possam se dividir e participar da adequada homeostase e reparação de tecidos. Assim, nicho de células  
15 tronco é a unidade funcional de qualquer tecido, contendo vários tipos de células residentes em interação harmônica com sua matriz extracelular, num microambiente que provê sinais intercelulares de pequeno alcance para manutenção do estado não-diferenciado das células.

Na presente invenção, apenas de forma particular, sem  
20 excluir qualquer outra, nichos de células tronco adequados são aqueles tipicamente compreendidos nos tecidos extraembrionários expulsos pelo corpo de uma mulher no momento de parto, particularmente a placenta, membrana  
25 amniótica e o cordão umbilical incluindo seus constituintes (por exemplo, veias, artérias, epitélio e tecido conjuntivo), preferivelmente após a remoção do sangue.

No texto que segue, apenas por facilidade de  
exposição, e como representativo de nichos naturais de  
30 células tronco (NNCT) adequados à invenção, serão feitas referências específicas ao tecido do cordão umbilical (TCU) íntegro, incluindo tecido conjuntivo mesenquimal (geleia de Wharton), artérias, veia e epitélio externo, depois da

retirada do sangue, sem que essa menção limite de qualquer forma à invenção quanto à utilização de outros NNCT, como por exemplo, tecido nervoso, muscular, adiposo, ósseo, cutâneo, derivados de órgãos, como fígado, pulmões, 5 coração, baço, fígado, pâncreas, testículos, ovários ou até mesmo derivados de biópsias, mas não se limitando por estes incluídos, como também outros tecidos pós-natais e adultos, até mesmo tecido cancerígeno que possua NNCT.

São conhecidos diversos métodos de isolamento de 10 células tronco a partir de tecidos ou substratos humanos. Até o presente, porém, nenhum método pode garantir a obtenção em grande escala de células em resposta à demanda crescente de células tronco e seus derivados para terapias, e para a produção em alta escala de moléculas bioativas 15 (peptídeos, fatores de crescimento, hormônios, etc.) que possuem propriedades tróficas dos pericitos e que poderão substituir as CT em muitas terapias.

Há inúmeras menções no estado da técnica a procedimentos em que substratos diversos do corpo humano 20 são submetidos a processos enzimáticos para obter e/ou recuperar células tronco. Entretanto, mesmo com a utilização de processos enzimáticos, não há divulgação de métodos que propiciem células tronco em grandes quantidades.

25 Sabe-se que quantidades substanciais de células tronco são necessárias para, entre outros, produção de tecidos, transplantes de órgãos, impressão de tecidos e/ou órgão completo, para cicatrização de um ferimento diretamente no paciente, para imunossupressão em muitas doenças 30 autoimunes. Há menções na bibliografia que esses tratamentos exigem uma quantidade de  $2 \times 10^6$  células por quilo de peso do paciente, células tronco estas padronizadas em relação às propriedades das CT e ao número

de passagens (repiques).

Como será visto a seguir, a presente invenção propicia um processo simples com alto rendimento para a obtenção de grandes quantidades de células tronco e progenitores, de  
5 forma essencialmente não enzimática.

Descrição da figura

Figura 1 - populações celulares obtidos pelo processo da invenção e por 2 métodos enzimáticos alternativos, após 72 horas em cultivo em A, B, C e após 5 dias em A1, B1 e C1.

10 Descrição da invenção

A presente invenção refere-se a um processo inovador de produção de células tronco adultas, particularmente células tronco mesenquimais/estromais multipotentes, e precursores peri-vasculares, por exemplo pericitos.

15 Diferentemente dos processos da arte anterior, o processo da invenção é essencialmente não enzimático, e baseia-se na propagação e isolamento da população das células tronco proliferamente ativas nos seus nichos, de forma biologicamente sinérgica (ou seja, em equilíbrio com  
20 seu meio). Não faz parte da invenção a maneira de verificar se determinado tecido é um nicho de células tronco, que é conhecida do técnico no assunto, por exemplo, por imunofluorescência e imunohistoquímica.

A presente invenção propicia um processo vantajoso e  
25 robusto de produção das células com 100% de sucesso e eficácia com relação aos tecidos processados, permitindo obtenção de grande número das células e mínimas perdas de tempo relacionadas ao processo de isolamento.

As células tronco mesenquimais (CTM) isoladas em  
30 grandes quantidades a partir do processo da invenção apresentam todas as características de células tronco mesenquimais e do tipo pericitos, seja para produção de moléculas medicinais utilizadas diretamente em terapia ou

na indústria farmacêutica para a produção de drogas. As CT obtidas pelo processo da invenção têm ampla capacidade de diferenciação (induzida ou espontânea) *in vitro* e *in vivo*; com ampla capacidade de regeneração de tecidos utilizando 5 meios de cultura e agentes e/ou substratos ("*scaffold*") em fase líquida, rígida ou gelatinosa do suporte ou ainda matriz extracelular (complexo de macromoléculas: componentes fibrosos, proteínas e polissacarídeos) de natureza diversa, naturais ou sintetizados.

10 Uma característica das Células tronco/progenitores produzidas pelo processo da invenção é apresentar o mesmo padrão de expressão dos marcadores relacionados com o estado não diferenciado que as células *in vivo* residentes nos fragmentos cultivados.

15 O processo da invenção compreende, de forma inovadora, o cultivo *in vitro* de nichos de CT (NNCT). Sem que seja uma justificação da invenção, sabe-se que o cultivo *in vitro* das células tronco fora do seu nicho habitual pode induzir mudanças na estabilidade cariotípica, fenotípica, 20 na sua assinatura molecular e na estabilidade genômica. Além disso, devido à divisão desigual das células tronco (que produzem uma célula tronco e um progenitor) elas perdem com as passagens a sua multipotencialidade (capacidade de produzir um espectro amplo dos tipos 25 celulares diferenciados). Essa população mista de células tronco mesenquimais advindas do nicho natural pode proporcionar uma maior sinergia biológica das células isoladas segundo o processo da invenção, o qual prescinde da remoção prévia dos vasos sanguíneos ou de qualquer outro 30 tecido, somente retirando-se o sangue presente.

Uma característica do processo da invenção é a cultura flutuante (ou 3D) de fragmentos teciduais dos NNCT, promovendo quantidades substanciais de células tronco e

progenitores substancialmente isentas de alterações genéticas e biológicas.

De acordo com a invenção, os fragmentos de tecidos são mantidos flutuantes em meio de cultura basal, produzindo 5 células tronco células tronco/progenitores. A liberação das CT ocorre através da migração natural das células dos fragmentos de NNCT para o plástico da garrafa de cultivo garantindo que ditas células irão manter a homogeneidade do perfil molecular da população e sobrevivência inalterados 10 após esse isolamento natural.

Observa-se que a cultura dos fragmentos de tecido flutuantes conforme a invenção apresenta de forma típica a seguinte dinâmica para a produção de CT: com o cultivo dos fragmentos de NNCT em suspensão ocorre eficiente difusão de 15 gases e nutrientes em todo o fragmento, as CT deixando o estado de quiescência e sua proliferação nos nichos sendo estimulada (ou seja, aumentando sua quantidade por divisão simétrica), ocorrendo também sua migração do interior dos fragmentos NNCT para a superfície dos mesmos em resposta à 20 fragmentação do tecido. Desta forma, os fragmentos se tornam mais densos e tangenciam/aderem temporariamente ao substrato do frasco de cultura, liberando as CT para migrarem para fora dos fragmentos e aderirem ao substrato. Após a adesão do fragmento ao substrato ocorre um acréscimo 25 da migração em detrimento à proliferação, pois a difusão de nutrientes/gases se torna aparentemente menos intensa. O fragmento então tende a se tornar mais leve devido à extensa migração das CT para o substrato e, de forma autônoma ou por simples agitação do frasco de cultura, o 30 fragmento se desprende do substrato e volta a flutuar. Novamente em flutuação, restabelece-se a difusão de gases e nutrientes para todo o tecido e um novo acréscimo da proliferação das CT nos nichos, e o fragmento novamente se

torna mais denso, estabelecendo um novo ciclo de adesão e liberação de CT e posterior flutuação. Esse sistema de flutuação-proliferação-sedimentação-adesão-migração-liberação pode se repetir diversas vezes durante o cultivo dos fragmentos de tecidos dos nichos naturais de CT, produzindo colônias de células tronco. Com o passar do tempo pode-se observar no fundo do frasco de cultivo múltiplas colônias compostas pelas células inventivas.

De acordo com uma realização preferencial, a cultura celular no fundo do frasco de cultura - cultura relativamente homogênea de células tronco com características de Células tronco/progenitores - é mantida semiconfluente, particularmente entre 70% e 90% de confluência, a fim de prevenir a diferenciação espontânea das células. Pelo termo "semiconfluente" entende-se cultura que não esteja tão densa a ponto das células entrarem em contato substancial umas com as outras como se verifica em culturas confluentes, de densidade alta.

Dentro de uma realização particular da invenção, contempla-se também modificações do meio de cultura basal, por adição de fatores de crescimento e/ou outras moléculas bioativas que podem alterar as características das células advindas do processo.

Dentro de uma realização particular da invenção, o tecido dos NNCT a ser cultivado pode ter um pré-tratamento brando inicial com enzimas de dissociação (p. ex. tripsina, colagenase, TrypLE™, etc.) antes da imersão desses tecidos em meio de cultura. Tal pré-tratamento não visa a digestão extensa do tecido, apenas um pequeno relaxamento da coerência do tecido para facilitar a movimentação das CT quando imerso no meio de cultura basal.

Terminado o processo da invenção, tratamento enzimático posterior das CT aderidas e suas respectivas

passagens (repiques) para outros recipientes para a multiplicação ou expansão *in vitro* ou *ex vivo* das Células tronco/progenitores resultantes, favorece o isolamento de pericitos.

5 Uma particularidade do processo da invenção está na retirada e transferência dos fragmentos dos NNCT, por qualquer maneira mecânica adequada, por exemplo, com auxílio de dispositivos como pipeta, pinça, agulha, ou aparelhos, ou por um simples despejo de um recipiente para  
10 outro. Após a transferência desses pedaços de tecido dos NNCT, que são os fragmentos flutuantes, para um novo recipiente, os mesmos podem dar continuidade à produção de CT em passagem zero (sem repique) uma vez que não se fez uso de tratamento enzimático.

15 O processo da invenção utiliza fragmentos de NNCT, que compreendem células tronco que proliferam dentro do tecido e que continuam a expressar os marcadores dos diversos tipos das células tronco mesmo após várias transferências mecânicas de tecido mencionadas.

20 O processo da invenção é minimamente invasivo no uso de nichos compreendidos em tecidos extraembrionários expulsos pelo corpo de uma mulher durante o parto, particularmente cordão umbilical, membrana amniótica e placenta. Entre outras vantagens das células tronco ali  
25 contidas deve-se mencionar a sua juventude. O envelhecimento dos mamíferos é associado com a redução na regeneração do tecido, o aumento das doenças degenerativa, e câncer. Como as células tronco regeneram muitos tecidos adultos e quando estas, por acúmulo de mutações, podem  
30 contribuir para o desenvolvimento de câncer, as mudanças relacionadas à idade em células tronco provavelmente contribuem para a morbidade relacionada à idade. Consistente com isto, a função de células tronco em vários

tecidos diminui com a idade, resultando possivelmente na perda da expressão de supressores de tumor, lesões do DNA, alterações na fisiologia celular, e alterações no ambiente dos tecidos. Permanece desconhecido se declínios na função de células tronco durante o envelhecimento influenciam a longevidade do organismo, no entanto os mecanismos que influenciam a longevidade também modulam a morbidade relacionada à idade, em parte, através de efeitos sobre células tronco. Portanto, as células tronco de tecidos extraembrionários ligados ao parto têm extrema importância para a terapia celular, por serem células jovens - destacando-se o fato que as células obtidas pelo processo da invenção não são células embrionárias.

Ainda que não essencial, é adequado ao processo da invenção uma lavagem inicial do tecido do NNCT, particularmente para remoção de sangue, antes da fragmentação do tecido que vai ser cultivado.

De forma particular a lavagem do NNCT é feita externa e internamente. Externamente por exemplo com água destilada ou solução salina tamponada estéril (PBS ou solução fisiológicas e antibióticos (tal como penicilina e estreptomicina a 2%)). Internamente por exemplo com lavagem do interior dos vasos (artérias e veias) com água destilada ou solução salina tamponada estéril (PBS ou solução fisiológica e antibióticos (tal como penicilina e estreptomicina a 2%)).

A fragmentação dos NNCT a serem cultivados conforme o processo da invenção pode ser feita de qualquer maneira adequada, por exemplo, com lâminas afiadas, por corte manual ou mecanizado, em condições estéreis. De maneira preferencial, sem que seja essencial, o corte deve ser feito como pouca pressão sobre o tecido, sem utilização de calor, sendo adequado um corte com cortador de jato de água

sob pressão.

Dentro de uma realização particular, a presente invenção trata também da criopreservação/descongelamento repetitivos dos fragmentos de tecido do(s) NNCT, permitindo  
5 assim a continuidade na produção de novas células tronco/progenitores em alta escala, particularmente quando envolver tecido de NNCT de um único paciente e em passagens baixas (tipicamente menor ou igual a 5). Tal aspecto, no entanto, não limita o processo da invenção, que pode fazer  
10 uso de NNCT de um único paciente, ou de dois ou mais pacientes distintos, ou ainda uso concomitante de diferentes NNCT de um ou mais pacientes, ou com mais passagens de NNCT.

As células obtidas conforme o processo da presente  
15 invenção expressam no seu estado não diferenciado um grupo de marcadores de CTM (CD29, CD73, CD90, CD105) concomitantemente com marcadores de pericitos (CD140b e CD166) e não expressam marcadores da linhagem hematopoiética (CD34 e CD45) nem marcadores de  
20 histocompatibilidade (HLA-DR). As células obtidas a partir do processo da invenção são multipotentes, capazes de autorrenovação com proliferação contínua e diferenciação *in vitro* com a utilização de condições conhecidas, por exemplo, adição de agentes indutores (p. ex., ácido  
25 retinóico, dimetil sulfóxido, etc.), fatores de crescimento e citocinas. Nessas condições, as células tronco/progenitores da invenção se diferenciam em diversos tipos celulares, tais como osso, cartilagem e gordura. Como as Células tronco/progenitores obtidas de acordo com a  
30 invenção também expressam o marcador CD31, característico de células progenitoras endoteliais, podem se diferenciar adicionalmente em células musculares, neurais e endoteliais.

As células e/ou fragmentos obtidas pelo processo da invenção são adequadas a inúmeras possibilidades de aplicação, tanto terapêutica, como não terapêutica, biotecnológica e farmacêutica.

5 A presente invenção visa, assim, um processo de obtenção de células tronco, particularmente Células tronco/progenitores multipotentes, a partir do cultivo de tecido de NNCT, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- 10 A - obtenção de um ou mais NNCT;  
B - pré-preparação de um ou mais NNCT;  
C - preparação de fragmentos de tecido de um ou mais NNCT;  
D - promover a propagação das CT via cultivo dos fragmentos de NNCT em meio de cultura basal;
- 15 E - separação das CT dos fragmentos de NNCT;  
F - opcionalmente, fragmentos de NNCT separados em E retornam à etapa D.

A menção a CT nas etapas do processo inclui células tronco e progenitores.

20 A etapa A do processo da invenção é particularmente realizada com a obtenção de um NNCT específico, como cordão umbilical. De maneira adequada, sem excluir quaisquer outras, o(s) NNCT(s) utilizado(s) no processo da invenção são tecidos advindos do parto de uma mulher,

25 particularmente cordão umbilical, membrana amniótica e placenta, ainda mais particularmente o cordão umbilical íntegro, com artérias e veia, geleia de Wharton e epitélio. Também são adequados à invenção tecido nervoso, muscular, adiposo, ósseo, cutâneo, derivados de órgãos, como fígado,

30 pulmões, coração, baço, fígado, pâncreas, testículos, ovários ou até mesmo derivados de biópsias, mas não se limitando por estes incluídos, como também outros tecidos pós-natais e adultos, até mesmo tecido cancerígeno que

possua NNCT.

Conforme o item B acima, o NNCT é submetido a uma pré-preparação, que pode ser limpeza, lavagem, pré-cortes no tecido, moagem, compressão, pré-tratamento brando com  
5 enzimas (colagenase, dispase, tripsina, TrypLE™, entre outras) de dissociação, etc.

De forma particular, o tecido do NNCT é submetido a limpeza/lavagem, visando remoção de sangue e outros substratos que possam afetar negativamente a propagação das  
10 CT durante o cultivo, por exemplo indução a diferenciação, intoxicação, contaminação, etc. No caso particular do cordão umbilical, lavagem adequada é efetuada tanto interna quanto externamente, por exemplo com um ou mais dentre água destilada, solução salina, solução fisiológica e  
15 antibióticos (por exemplo penicilina e estreptomicina). A lavagem interna é feita, por exemplo, injetando o substrato de lavagem nos vasos internos do tecido, e removendo o material assim arrastado.

Dentro de uma realização particular, faz-se a lavagem  
20 e limpeza do cordão umbilical, por exemplo, em trechos pré-cortados de 5 a 10 cm a partir da veia do cordão, evitando a inclusão de trombos sanguíneos.

Ainda conforme a etapa B, a pré-preparação pode envolver um pré-tratamento brando inicial do tecido com  
25 enzimas de dissociação (p. ex. tripsina, colagenase, TrypLE™, etc.). Tal pré-tratamento não visa à digestão extensa do tecido, apenas um pequeno relaxamento da coerência do tecido para facilitar a movimentação das CT quando imerso no meio de cultura basal.

30 Em relação à etapa C do processo da invenção, a maneira de fragmentar o tecido do NNCT, como já mencionado, é de qualquer forma adequada à finalidade. No caso de cordão umbilical são adequados fragmentos obtidos a partir

de cortes transversais e/ou longitudinais até atingir, por exemplo, cubos com dimensões a partir de 0,5 a 1 cm. Qualquer outra dimensão ou formato de fragmento estão incluídos no escopo da invenção, mesmo partículas obtidas  
5 por moagem do(s) tecido(s).

Ainda em relação à etapa C, em uma realização particular da invenção, a fragmentação de um NNCT visa utilizar apenas partes específicas dos tecidos íntegros para o cultivo na etapa D seguinte. Por exemplo, no caso de  
10 cordão umbilical, podem ser utilizados fragmentos só das veias, só das artérias, só de epitélio, ou só da geleia de Wharton, cada qual gerando Células tronco/progenitores particulares. São fragmentos oriundos dos constituintes do NNCT (veia, artéria, epitélio, etc.) podem ser utilizados  
15 separadamente de acordo com a finalidade desejada para a produção de células com assinatura molecular, potencial de diferenciação e produção das moléculas ativas específicas, ou podem ser utilizados em conjunto.

Em relação à etapa D do processo da invenção, o meio  
20 basal para cultura dos fragmentos de cordão umbilical e/ou das células dos NNCT é qualquer, desde que permita a propagação/expansão e isolamento de células tronco e progenitores com as mesmas características fenotípicas e moleculares. É adequado, por exemplo, o meio DMEM/F12  
25 ("*Dulbecco's modified Eagle's medium*"/Ham's F12, 1:1, da empresa Invitrogen, EUA) ou qualquer substrato equivalente, como conhece o técnico no assunto, tipicamente contendo aminoácidos, proteínas, soro e antibiótico.

O referido meio basal de cultura, de forma adequada,  
30 compreende soro, por exemplo, 15% em peso, ou menos ou mais. De forma particular o dito soro é de origem bovina, por exemplo, soro fetal bovino, sendo também adequados soros de humanos (p.ex. plasmas ricos ou pobres em

plaquetas) e de outros animais, inclusive misturas dos mesmos, assim como outros reagentes sintéticos ou naturais que possam permitir o isolamento das CT.

O meio de cultura da etapa D adequadamente contém  
5 antibiótico e/ou aminoácidos. Os antibióticos utilizados são de conhecimento do técnico no assunto, por exemplo, uma combinação de penicilina e estreptomicina ou gentamicina. Entre os aminoácidos úteis para a realização da invenção estão a glutamina, aminoácidos não essenciais, ou misturas  
10 dos mesmos.

De forma particular, efetua-se durante a etapa D a troca/renovação frequente do meio de cultura, pois os fragmentos de tecidos do NNCT consomem o meio mais rapidamente do que as células. É adequada a troca do meio  
15 conforme o seu pH mude de básico para ácido, o que pode por exemplo ser avaliado pela mudança da cor do meio de cultivo, tipicamente de rosa para amarelo, ou de qualquer outra maneira adequada.

De forma opcional, após a etapa D do processo da  
20 invenção, pode ser feito um concentrado contendo tanto fragmentos de NNCT quanto células tronco obtidas (por exemplo, retirando parte ou todo do meio de cultura basal), e tal concentrado preservado para uso em momento futuro. A preservação de tal concentrado é, por exemplo, via  
25 criopreservação, de formas conhecidas pelo homem da técnica. O uso desse concentrado em momento futuro faz se adequadamente com o descongelamento, nova inserção em meio de cultura basal, e posterior separação das células/progenitores dos fragmentos conforme o item E  
30 acima.

Dentro de uma realização particular, o concentrado de fragmentos de NNCT e/ou células tronco obtidas e/ou meio condicionado pelo cultivo pode também ser liofilizado, com

utilizações adicionais além da reutilização no processo da invenção (etapa D).

Conforme a etapa E do processo da invenção, fragmentos de tecido de NNCT, após um ciclo de cultivo, são isolados  
5 mecanicamente e podem - conforme etapa F - ser re-submetidos ao cultivo da etapa D, seja de forma imediatamente subsequente, seja após procedimento de estocagem (criopreservação). A reutilização dos fragmentos em novos cultivos pode ser feita até que se esgote sua  
10 capacidade em liberar CT/progenitores. Tais fragmentos originados da etapa E podem ser misturados com novos fragmentos, originados após as etapas A, B e C, ainda não previamente utilizados, para cultivo na etapa D.

Dentro de uma realização particular, os fragmentos de  
15 NNCT podem também ser descelularizados e/ou digeridos e/ou liofilizados após a etapa E, visando utilizações adicionais além da reutilização conforme a etapa F do processo da invenção.

O tratamento que se pode dar às CT/progenitores  
20 aderentes, após separação dos fragmentos conforme o item E acima, é em si conhecido do técnico no assunto. As células são tipicamente lavadas, por exemplo, com solução salina tamponada estéril, com ou sem antibióticos, para então se efetuar sua dissociação (pois as células estão  
25 semiconfluentes), seja por meios mecânicos ou enzimáticos, para efetuar sua colheita. Preferencialmente, a dita dissociação é realizada por meios enzimáticos, particularmente por meio de utilização de Tryple™ (comercializado pela empresa norte-americana Invitrogen)  
30 que é uma enzima recombinante excepcionalmente pura, livre de componentes de origem animal, branda para as células. Também pode ser utilizada uma solução de cerca de 0,25-0,05% de tripsina/ácido etilenodiaminotetracético (EDTA),

por exemplo comercializada pela empresa Sigma-Aldrich. Na sequência as células colhidas são tipicamente submetidas à repicagem via meios enzimáticos, ou criopreservadas para utilização posterior, conforme processos conhecidos pelo  
5 homem da técnica.

Dentro de uma realização particular, as CT/progenitores obtidas pelo processo da invenção, isoladas conforme a etapa E do processo da invenção, podem também ser submetidas à liofilização para utilizações específicas.  
10 O meio de cultivo condicionado pelas células e/ou fragmentos pode também ser liofilizado para a produção de substratos de cultivos, moléculas bioativas, suplementos nutricionais e para uso estético.

A criopreservação de fragmentos de tecido de NNCT, ou  
15 das CT/progenitores, ou de suas misturas, possíveis após a etapa E do processo da invenção, são adequadamente realizadas em freezer, com temperaturas em torno de  $-80^{\circ}\text{C}$ , e posteriormente em nitrogênio líquido, com temperaturas em torno de  $-196^{\circ}\text{C}$ , como sabe fazer o homem da técnica.

20 Após o item E do processo da invenção, tipicamente as CT/progenitores isoladas são submetidas a repicagem (passagem) enzimática, conforme processos conhecidos o homem da técnica, em número adequado ao fim desejado. Verifica-se grande estabilidade de marcadores das CT da  
25 presente invenção após grande número de passagens, por exemplo, 25 ou mais.

O cultivo dos fragmentos de tecido de NNCT assim como a multiplicação por repicagem das CTprogenitores resultantes do processo da presente invenção pode ser  
30 efetuado sobre microcarregadores (microcarriers) ou em biorreatores conhecidos, destinados à produção de células em alta escala, como conhecido nessa área técnica.

EXEMPLOS

São dados a seguir exemplos de realização da presente invenção, com a finalidade de ilustrar sua realização, sem impor qualquer limitações além daquelas expressas nas reivindicações anexas.

#### 5 Exemplo 1

Processamentos de cordão umbilical e cultivo de células

A descrição deste exemplo representa a média de inúmeras realizações efetuadas da mesma forma.

A partir de um cordão umbilical íntegro foi preparado  
10 um fragmento de 5 cm, sem trombos, e o mesmo foi duas vezes  
lavado por fora e por dentro (neste caso com uma agulha em  
uma seringa) com solução salina tamponada estéril [0,01 M  
PBS pH7,4] contendo antibióticos [100 unidades/ml de  
penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina] para eliminar ao  
15 máximo possível contaminação com sangue. Nas primeiras  
lavagens internas a solução da lavagem ainda saiu  
contaminado com o sangue apresentado cor avermelhada.  
Adicionalmente, se utilizou água estéril injetada nos vasos  
do cordão umbilical, a solução de lavagem mantendo-se  
20 incolor. Em seguida, utilizando um bisturi, o cordão foi  
cortado no sentido longitudinal e transversal, até obter  
cerca de 35 fragmentos de tamanho aproximado 0,5 x 0,5 cm,  
e em seguida transferidos para um frasco de 75 cm<sup>2</sup>  
(Corning, NY) contendo meio DMEM/F12 (Dulbecco's modified  
25 Eagle médium/Ham's F12, 1:1, comercializado pela empresa  
Invitrogen, EUA) suplementado com 15% de soro fetal bovino  
(FBS, comercializado pela empresa Hyclone, EUA), 100  
unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2  
mM L-glutamina, e 2 mM aminoácidos não-essenciais. A  
30 garrafa foi mantida em estufa de CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida e  
temperatura 37°C. Os fragmentos começaram a soltar as  
células a partir dos dias 2-3 ou 5-7, variação individual  
observada em outras realizações do processo da invenção. O

crescimento da cultura de células dos fragmentos de cordão umbilical foi mantido nestas condições por duas semanas. A cor do meio foi mantida rosa (básica) e não amarelo (ácida), por substituição diária, constatando-se que o tecido consome o meio muito rapidamente. Os fragmentos foram mantidos flutuando ou boiando no meio de cultura. Assim que o fundo de garrafa foi coberto pelas células, formando colônias individuais semiconfluentes, em 5-7 ou 9-11 dias, conforme variação observada com fragmentos diferentes, os fragmentos foram transferidos, por simples despejo, para outro frasco do mesmo tamanho.

As células aderentes nas garrafas apresentaram uma morfologia semelhante à dos fibroblastos, alta taxa de proliferação e em 2 semanas aproximadamente  $4 \times 10^6$  células foram geradas a partir dos 35 fragmentos. As células do cordão umbilical apresentaram alta capacidade de formação de colônias individuais e na passagem 1 a frequência de formação de colônias de células foi de cerca de 100 colônias/100 células plaqueadas numa placa de  $90\text{cm}^2$ . A cinética de crescimento de uma única colônia derivada das células do cordão umbilical foi mensurada na passagem 1. Durante 16 dias, as células foram coletadas e contadas diariamente e nenhuma alteração na taxa de crescimento foi observada. Não foram observadas alterações na morfologia ou no padrão de crescimento destas células tronco/progenitores após 25 passagens.

Estas células apresentaram cariótipo normal em todas as linhagens obtidas e nenhuma alteração pode ser observada após 10 passagens.

Exemplo 2 - comparação do método da invenção com método enzimático do estado da técnica

Um cordão umbilical foi isolado e dividido em três partes iguais (aprox. 5 cm). A primeira parte foi

processada conforme descrito no Exemplo 1 e foi transferida diretamente para o meio de cultivo. A segunda e terceira partes foram lavadas e fragmentadas processadas conforme descrito no exemplo 1, para em seguida serem tratadas com colagenase (0,1% colagenase por duas horas) e TrypLE™ (por 30 minutos), respectivamente. Na figura 1 pode-se observar a diferença entre populações celulares obtidos por estes três métodos, após 72 horas em cultivo em A, B, C e após 5 dias em A1, B1 e C1. Pode-se observar a diferença na morfologia das células, sendo em A e A1 mais definida e fusiforme, assim como na quantidade de células aderidas que começam a formar colônias. A proliferação destas células foi avaliada através do plaqueamento em número igual de células ( $10^3$  por  $25\text{cm}^2$ ), observa-se que enquanto as células inventivas já atingiram 90% de confluência com quantidade de  $10^6$  células em 5 dias e foram congeladas, as células obtidas pelos métodos enzimáticos atingiram somente 70% de confluência (vide Tabela 1 abaixo). O número de passagens não se conta durante a transferência dos fragmentos, portanto cada transferência produzirá células na passagem 0. Desta forma, levando em consideração as transferências múltiplas dos fragmentos, o número de células em passagem baixa (até a P5 ou passagem 5) que é contada como a passagem limite na sua utilização terapêutica é praticamente não limitada.

Tabela 1 - comparação de aspectos da invenção em relação aos métodos enzimáticos alternativos da figura 1.

Fatores para a produção de células	Não enzimático flutuante Conforme a invenção	Colagenase Conforme estado da técnica	TrypLE™
Proliferação de células	mais alta	alta	alta
Congelamento de tecido	possível	possível	possível
Congelamento das células	possível	possível	possível

Número das passagens para a terapia	Não-limitado	limitado	limitado
Número das células	Não-limitado	limitado	limitado
Produção na escala industrial para aplicação terapêutica e biotecnológica	Não-limitada	limitada	limitada

Exemplo 3 - Caracterização por citometria de fluxo das células obtidas segundo o processo da invenção, cultivadas in vitro.

Para a análise por citometria de fluxo foram  
5 utilizados os anticorpos contra as moléculas de superfície celular e seus respectivos isotipos controle, tais como: monoclonal anti-CD45, (da empresa Sigma, EUA), CD90 (da empresa BD-Pharmigen, EUA), e CD105, CD73 (da empresa Serotec, Reino Unido) humanos. Um milhão de células são  
10 incubadas com os anticorpos durante 30 minutos no gelo, lavadas com PBS contendo 2% de soro fetal bovino e 1  $\mu$ M de azida sódica, seguido de adição de FITC (fluoresceína isotiocianate) ou PE (ficoeritrina). A análise por citometria de fluxo é realizada em um FACS (Fluorescence-  
15 Activated Cell Sorter, da empresa Becton, Dickson, EUA) utilizando o programa CELLQuest (da empresa Becton, Dickson, EUA).

A caracterização por citometria de fluxo na passagem revela que as células obtidas segundo o processo da  
20 invenção são positivas para os marcadores das células tronco mesenquimais.

*Diferenciação in vitro*

Para a diferenciação neuronal, as células inventivas são mantidas confluentes durante uma semana no frasco de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, contendo meio DMEM suplementado com 20% de soro Knockout (da empresa Invitrogen, EUA), 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, e 2 mM de L-glutamina. Então, elas são coletadas através do uso da solução 0,05% de tripsina/EDTA e plaqueadas em alta densidade em placas de petri de 35 cm<sup>2</sup> contendo o mesmo meio de cultura. A diferenciação neuronal é também induzida por adição de ácido retinóico all-trans (RA) (da empresa Sigma, EUA). A suspensão de células inventivas obtida por tripsinização é transferida para uma placa de petri de 35 cm<sup>2</sup>, pré-tratadas com solução 0,1% agarose (da empresa Sigma, EUA), contendo meio de cultura neurobasal (da empresa Invitrogen, EUA) suplementado com B27. Após 24 horas, as células formam estruturas esféricas e a diferenciação neuronal é induzida pela adição de RA (ácido retinóico) e DMSO (dimetil sulfóxido), numa concentração final de 10<sup>-7</sup> M e 0,05%, respectivamente, sendo o dito meio trocado diariamente. Após quatro dias de cultivo em condições não aderentes, as SLS são aderidas em placas tratadas com 0,1% de gelatina contendo meio de cultura adequado.

Para diferenciação adipogênica, as células foram cultivadas em meio DMEM, com 10% soro fetal bovino, 0,25M isobutilmetilxantina, 10 µM insulina e 1% penicilina. A

troca do meio indutor foi realizada a cada 3 dias e mantido por 20 dias. Após este período, as células foram fixadas por 60 minutos a temperatura ambiente com paraformaldéido 4% e lavadas algumas vezes com etanol 70%. Na etapa  
5 seguinte foram encubadas a temperatura ambiente por cinco minutos com Oil Red O, o excesso de corante foi retirado com algumas lavagens com água destilada. As células apresentam a coloração positiva para Von Kossa.

Para diferenciação condrogênica, as células foram  
10 cultivadas em meio DMEM, com 1% soro fetal bovino, 6.25 µM insulina, 10 ng/ml TGF- $\mu$ 1 e 1% penicilina. A troca do meio indutor foi realizada a cada 3 dias e mantido por 21 dias. Após este período, as células foram fixadas com paraformaldéido 4% em temperatura ambiente e coradas com  
15 Alcian Blue. A diferenciação condrogênica pode ser confirmada pela coloração específica para safranina e toluidina.

Sabe-se que a partir das informações aqui fornecidas, com o auxílio dos exemplos dados, o homem da técnica é  
20 capaz de efetuar realizações não explicitamente aqui mencionadas, que desempenham funções semelhantes para atingir resultados de mesma natureza, que - portanto - estão abrangidas pelo escopo de proteção auferido pelas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MULTIPOTENTES E PROGENITORES, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- 5           A - obtenção de um ou mais nichos naturais de células tronco (NNCT);
- B - pré-preparação de um ou mais NNCT;
- C - preparação de fragmentos de tecido de um ou mais NNCT;
- 10           D - promover a propagação das células tronco e progenitores (CT) via cultivo dos fragmentos de NNCT em meio de cultura basal;
- E - separação das CT dos fragmentos de NNCT;
- F - opcionalmente, fragmentos de NNCT separados em E
- 15 retornam à etapa D.

2. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato dos ditos NNCT serem um ou mais dentre tecidos extraembrionários originados de parto, tecido nervoso, muscular, adiposo, ósseo, cutâneo,

20 derivados de órgãos, como fígado, pulmões, coração, baço, fígado, pâncreas, testículos, ovários, derivados de biópsias, tecido cancerígeno que possua NNCT.

3. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato dos ditos NNCT serem um ou mais

25 dentre cordão umbilical, placenta, membrana amniótica.

4. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da dita pré-preparação do NNCT na etapa B ser um ou mais dentre limpeza, lavagem, pré-cortes no tecido, moagem, compressão, e pré-tratamento brando com

30 enzimas de dissociação.

5. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da dita fragmentação na etapa C ser feita em tecido de NNCT íntegro.

6. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do dito meio de cultura na etapa D conter os nutrientes necessários à expansão das células contidas nos NNCT, particularmente aminoácidos, proteínas, soro e antibiótico(s).

7. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato do dito meio de cultura na etapa D ser trocado com a frequência necessária para evitar a mudança de pH de ácido para básico.

8. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os fragmentos na etapa E são removidos por meios mecânicos.

9. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato das células tronco e progenitores na etapa E serem separados dos fragmentos de tecido, lavadas e removidas após atingirem estado semiconfluyente entre 70% e 90%.

10. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que fragmentos de NNCT, separados após a dita etapa E e retornando à dita etapa D, podem ser misturados com fragmentos obtidos conforme as etapas A, B e C.

11. CÉLULAS TRONCO E/OU PROGENITORES caracterizados por serem obtidos por processo conforme uma qualquer das reivindicações 1 a 10.

12. FRAGMENTOS DE TECIDOS DE NNCT caracterizados por serem obtidos por processo conforme uma qualquer das reivindicações 1 a 10.

13. CONCENTRADO DE CÉLULAS TRONCO, progenitores e fragmentos de tecidos de NNCT caracterizado por ser obtido do processo conforme uma qualquer das reivindicações 1 a 10.

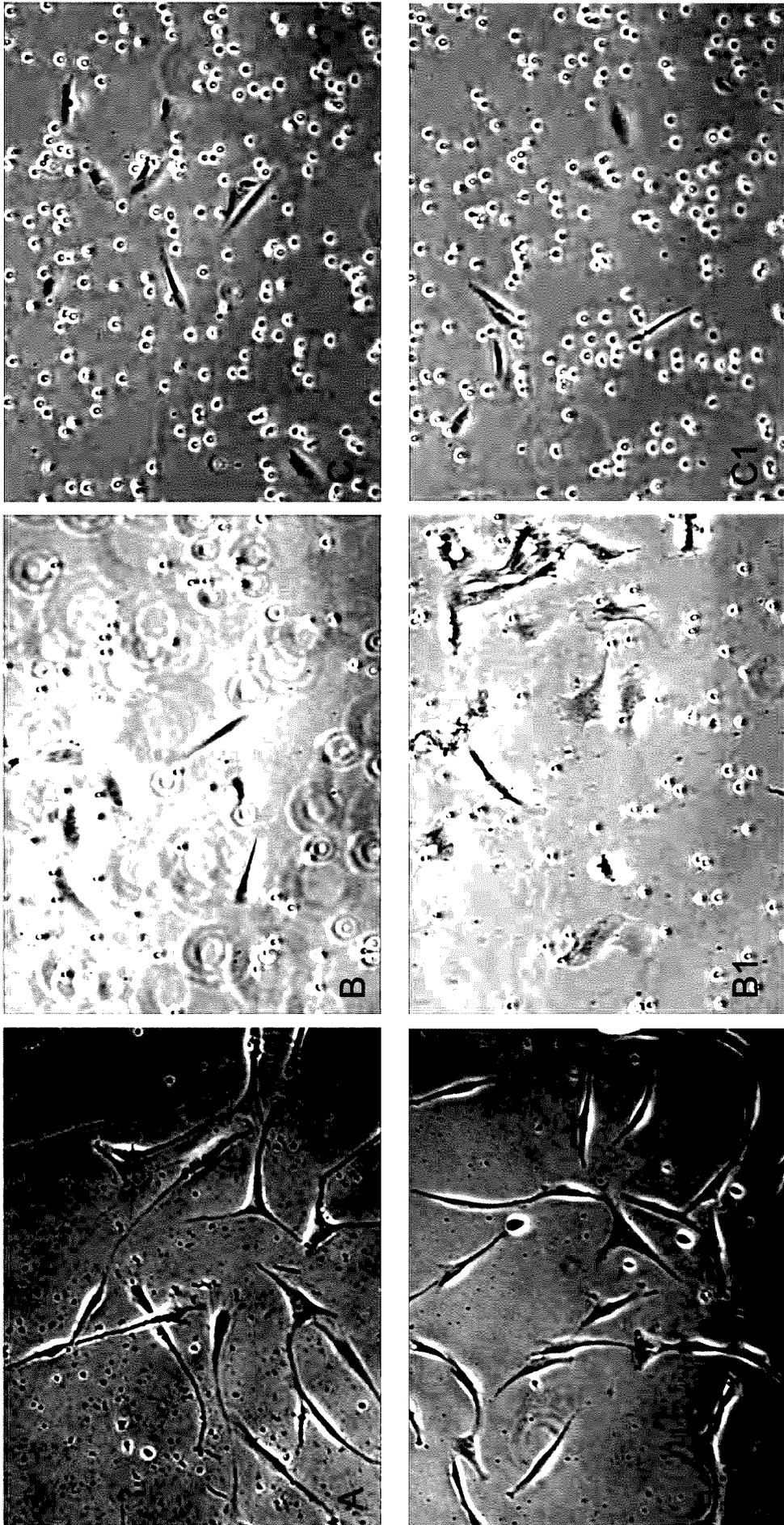


FIG. 1

RESUMO

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MULTIPOTENTES E PROGENITORES, CÉLULAS TRONCO E/OU PROGENITORES, FRAGMENTOS DE TECIDOS DE NNCT E CONCENTRADO DE CÉLULAS TRONCO

5 A presente invenção refere-se a um processo não enzimático de produção de células tronco multipotentes e progenitores a partir do cultivo de nichos das células tronco.