



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

(21) PI 1103059-3 A2



(22) Data de Depósito: 06/06/2011
(43) Data da Publicação: 12/11/2013
(RPI 2236)

(51) Int.Cl.:
C12N 5/0735

(54) Título: PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE UM SUBSTRATO DE CULTIVO PARA CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES E SUBSTRATO DE CULTIVO PRODUZIDO PELO MESMO

(73) Titular(es): Universidade Federal do Rio de Janeiro

(72) Inventor(es): Mariana Paranhos Stelling, Stevens Kastrup Rehen

(57) Resumo: PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE UM SUBSTRATO DE CULTIVO PARA CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES E SUBSTRATO DE CULTIVO PRODUZIDO PELO MESMO. O presente pedido de patente de invenção compreende um substrato para o cultivo de células-tronco pluripotentes, o qual é gerado a partir da fixação por etanol de células de fibroblastos fetais de camundongo, e o processo de obtenção do mesmo. A invenção tem o objetivo de estabelecer um substrato com a complexidade necessária para garantir pelo menos 95% das células mantidas pluripotentes. Além disso, o uso de camadas de células alimentadoras é substituído, as condições de cultivo são mantidas e a contaminação com moléculas animais pela matriz é eliminada, sendo um substrato de baixo custo e compatível com a demanda científica nacional.

PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE UM SUBSTRATO DE CULTIVO PARA
CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES E SUBSTRATO DE CULTIVO
PRODUZIDO PELO MESMO

Campo da invenção:

5 O presente pedido de patente descreve um substrato de cultivo para células-tronco embrionárias humanas e seu processo de obtenção, o qual se destina ao campo de produtos para pesquisa científica na área biológica e possui potencial para futuro uso na clínica médica.

10 A invenção pode ser utilizada para todos os tipos de células pluripotentes (embrionárias e induzidas), tanto murinas quanto humanas. Também pode ser produzido em larga escala, gerando produtos de baixa perecibilidade.

Fundamentos da técnica:

15 A manutenção das características das células-tronco pluripotentes demanda o uso de substratos complexos, tais como camadas de células alimentadoras de fontes animais ou extratos completos de matriz extracelular.

20 Tais substratos permitem o crescimento celular e sua manutenção funcional, porém, ao mesmo tempo, contaminam as células-tronco com moléculas imunogênicas que podem causar problemas em casos de transplantes.

25 As principais formas de produzir substratos de cultivo para células-tronco embrionárias são a matriz produzida *in loco*, matrigel e proteínas purificadas. A matriz produzida *in loco* e o matrigel consistem em substratos completos de matriz extracelular, enquanto as proteínas purificadas representam um substrato específico, que contém apenas um ou dois tipos de moléculas presentes.

30 A matriz produzida *in loco* consiste no cultivo de

células produtoras de matriz que, após produção da matriz, são lisadas e eliminadas, deixando o substrato livre de células vivas. Uma das maneiras mais comuns de realização deste procedimento é pelo tratamento químico com a amônia, cuja função é eliminar o corpo celular e deixar o substrato apenas com as moléculas da matriz. No entanto, as moléculas não são fixadas ao substrato e são perecíveis, apresentando um curto período de uso. Para o cultivo específico de células-tronco pluripotentes humanas, tal substrato só pode ser utilizado em combinação com outros fatores.

O extrato de matriz em forma de gel é comercializado sob o nome de matrigel e consiste em uma mistura gelatinosa de proteínas, lipídios e carboidratos, que são produzidos por células de camundongo. O matrigel tem sido utilizado no cultivo de células-tronco embrionárias humanas há cerca de uma década, porém também requer o uso combinado com outros fatores, o que o torna mais custoso.

O uso de proteínas purificadas de matriz extracelular, como a laminina e a fibronectina, também requer condições especiais de cultivo, uma vez que o substrato acelular produzido por proteínas purificadas não é tão rico quanto a matriz completa produzida pelo próprio fibroblasto.

Células-tronco pluripotentes humanas são cultivadas em meio condicionado, os quais podem ser:

- Substrato celular (MEF - fibroblastos embrionários murinos) + FGF-2 (4 a 8ng/mL)
- Substrato acelular + FGF-2 (40 a 100ng/mL)
- Substrato acelular + FGF-2 (4 a 8ng/mL) + meio condicionado com MEF

Assim, pode-se observar que, quando o substrato de

cultivo é acelular, não há modelo de cultivo de células-tronco em baixa concentração de FGF-2 sem que haja o condicionamento do meio com MEF.

A presente invenção descreve um substrato no qual as
5 camadas de células alimentadoras são substituídas por células de fibroblastos fetais de camundongo. Assim, obtém-se um substrato altamente eficiente, que apresenta baixo teor de contaminação cruzada, armazenamento simples e por longo período de tempo sem alteração das características,
10 além de baixo custo de produção.

Estado da técnica:

O documento de anterioridade US 2003175956 A1 descreve um método que permite a proliferação indiferenciada de células-tronco em uma matriz extracelular fibroblástica com
15 meio nutriente adicionado de FGF, no qual o ambiente de crescimento não apresenta células alimentadoras. A matriz descrita neste documento só é eficiente se for utilizado um meio condicionado na presença de FGF-2 (5 ng/mL), enquanto que, no presente pedido, a matriz pode ser utilizada com
20 qualquer meio de cultivo próprio para células-tronco pluripotentes humanas. Além disso, o modo de preparo do substrato também é diferente, tratando-se de uma lise celular provocada pelo hidróxido de amônio.

O documento de anterioridade CN 1986781 A revela um
25 método para o cultivo de células-tronco mesenquimais em um ambiente contendo uma matriz extracelular separado a partir de fibroblasto humano. Por outro lado, a invenção pleiteada neste pedido destina-se ao cultivo de células-tronco pluripotentes.

30 O documento europeu EP 2267116 A1 se refere a um meio

nutriente, ausente de células alimentadoras e com pelo menos 80 ng/mL de FGF, para a proliferação indiferenciada de células-tronco pluripotentes. De acordo com o protocolo apresentado na EP, a adaptação celular na matriz ocorre
5 após 6 passagens (aproximadamente 42 dias), enquanto que, na presente invenção, apenas 2 passagens (cerca de 14 dias) são suficientes para a adaptação. Além disso, o substrato acelular ora descrito é composto de uma matriz completa gerada por fibroblastos.

10 O documento coreano KR 20080087264 A revela uma matriz de fibroblasto de placenta para proliferação e aderência de células-tronco mesenquimais oriundas do cordão umbilical, enquanto que a presente invenção serve para o cultivo de células-tronco pluripotentes e a preparação do substrato é
15 diferente.

O documento WO 2009079409 A1 descreve um substrato de cultivo que compreende uma mistura de fibronectina e albumina (proteínas purificadas), o qual deve ser acrescido de altas concentrações de FGF-2 com a finalidade de manter
20 as características das células-tronco.

O pedido brasileiro BR 0514778 A ensina um método para o cultivo de células-tronco humanas não diferenciadas em matriz enriquecida na ausência de células alimentadoras. As células-tronco são cultivadas em alta concentração de FGF-2
25 (40 a 100 ng/mL), enquanto que na presente invenção utiliza-se apenas 4 a 8 ng/mL de FGF-2.

O pedido BR 0514641 A ensina a formação de uma matriz humanizada para cultura de células-tronco embrionárias compreendendo colágeno, fibronectina, vitronectina e
30 laminina, com adição de fator de crescimento de fibroblasto

em uma concentração de pelo menos 40 ng/ml. No entanto, uma mistura de proteínas como descrito neste pedido não possui as mesmas características biológicas de uma matriz completa.

5 Sumário da Invenção:

O presente pedido de patente de invenção compreende um substrato para o cultivo de células-tronco pluripotentes, o qual é gerado a partir da fixação alcoólica de células de fibroblastos fetais de camundongo, e o processo de obtenção do mesmo.

A invenção tem o objetivo de estabelecer um substrato com a complexidade necessária para garantir pelo menos 95% das células mantidas pluripotentes.

Além disso, o uso de camadas de células alimentadoras é substituído, as condições de cultivo são mantidas e a contaminação com moléculas animais advindas da matriz é eliminada, sendo um substrato de baixo custo e compatível com a demanda científica nacional.

Descrição das Figuras:

20 As Figuras 1A e 1B são fotomicrografias que mostram a morfologia típica de colônias características de células-tronco pluripotentes sob condição controle (A) e MEF etanol (B), respectivamente.

A Figura 1C é um gráfico que demonstra o ritmo de crescimento celular em ambas as condições de (A) e (B).

As Figuras 2A, 2B, 2C e 2D são gráficos que mostram os níveis dos marcadores de pluripotência Oct-4, SOX-2, SSEA-4 e TRA-1-60, respectivamente, nas células-tronco cultivadas sob condição controle e MEF etanol.

30 As Figuras 3A e 3B são fotomicrografias que mostram a

morfologia típica de corpos embrióides formados a partir de células-tronco cultivadas sob os substratos controle (A) e etanol (B), respectivamente.

A Figura 3C é um gráfico que analisa o diâmetro dos 5 corpos embrióides em ambas as condições de (A) e (B).

A Figura 4 é um gráfico que demonstra a quantificação dos níveis de ácido siálico Neu5Gc nas células-tronco.

Descrição detalhada da invenção:

O presente pedido de patente descreve um substrato de 10 cultivo para células-tronco embrionárias humanas, o qual é produzido pelo tratamento de fibroblastos de camundongo com etanol, que promove a lise celular e leva à fixação da matriz.

O substrato ora descrito apresenta uma complexidade 15 mínima necessária para garantir pelo menos 95% das células mantidas pluripotentes, além de apresentar baixo custo e ser imunocompatível.

Processo de obtenção do substrato:

O substrato desta invenção é obtido da seguinte forma:

20 Etapa 1:

As placas de petri próprias para o cultivo celular (ou seja, que apresentam superfície negativamente carregada) são rinsadas com uma solução 0,1% de gelatina estéril e colocadas abertas em fluxo laminar até a secagem do 25 líquido.

Este passo tem a função de garantir a boa adesão das células a serem cultivadas à superfície da placa.

Etapa 2:

Prepara-se o meio de cultivo dos fibroblastos, o qual 30 consiste em:

- DMEM/F12 (meio base)
- 10% soro fetal bovino
- 2mM glutamina
- 0,2% 2-mercaptoetanol

5 Etapa 3:

O criotubo contendo os fibroblastos embrionários murinos é descongelado em banho-maria a 37°C com leve agitação manual por 1 a 2 minutos e, em seguida, são diluídas em meio de fibroblasto na proporção de 1 parte de
10 meio de congelamento para 2 partes de meio de fibroblasto.

O material é centrifugado a 240 g por 5 minutos, o sobrenadante sendo descartado e o pellet (células) sendo suspenso novamente em meio de fibroblastos.

Etapa 4:

15 Os fibroblastos descongelados são plaqueados nas placas em uma densidade de $2,6 \times 10^4$ células/cm² e incubados a 37°C em 5% CO₂ por 48 horas.

Etapa 5:

20 Após 48 horas de incubação, as placas cultivadas são rinsadas com água estéril, com volume suficiente para cobrir toda a superfície da placa.

Etapa 6:

25 A água é aspirada e aplica-se o mesmo volume de etanol 70%, deixando-se a placa tampada no fluxo laminar por 5 minutos à temperatura ambiente, sendo o etanol aspirado em seguida.

Etapa 7:

30 A placa é novamente rinsada com etanol 70%, aspirada e seca destampada em fluxo laminar por aproximadamente 5 a 10 minutos.

Etapa 8:

A placa é selada com parafilm ou guardada em embalagem estéril e acondicionada a 4°C por até 2 meses ou a temperatura ambiente por até 1 semana.

- 5 Ainda, para armazenamentos mais longos (superior a 2 meses), a placa deve ser acondicionada com solução de etanol 70% a -20°C.

Etapa 9:

10 Para utilização da placa para o cultivo de células-tronco pluripotentes, deve-se deixar a placa atingir a temperatura ambiente e plaqueá-la.

Em caso de células-tronco embrionárias murinas, o meio deve ser complementado com o fator LIF (mesma concentração utilizada para o cultivo sobre camadas alimentadoras 15 inativadas).

Para células-tronco embrionárias humanas, o uso do fator FGF-2 na concentração de 8 ng/mL é suficiente para a manutenção das características das células, mas pode-se utilizar concentrações superiores de acordo com o meio de 20 cultivo utilizado.

Testes e resultados:

- Quanto à morfologia e crescimento celular:

25 As figuras 1A e 1B representam fotomicrografias em campo claro (escala 50µm) que mostram a morfologia típica de colônia característica das células-tronco pluripotentes.

Células da linhagem H9 foram cultivadas sobre uma condição controle (A) e no substrato MEF etanol (B) aqui descrito.

30 Conforme pode ser observado no gráfico 1C, o ritmo de crescimento das células H9 não foi alterado ao se comparar

as condições controle e MEF etanol.

Assim, comprova-se que as células-tronco pluripotentes humanas mantêm sua morfologia e ritmo de crescimento característicos no substrato MEF etanol.

5 - *Quanto à pluripotência da cultura:*

A figura 2 ilustra graficamente a quantificação dos marcadores de pluripotência Oct-4 (A) e SOX-2 (B), através de fotomicrografias de imunomarcação das células-tronco pluripotentes, e a quantificação dos marcadores SSEA-4 (C) e TRA-1-60 (D) através de análise por citometria.

10 Isso significa que as células-tronco pluripotentes humanas da linhagem H9 mantêm altos níveis dos marcadores de pluripotência Oct-4, SOX-2, SSEA-4 e TRA-1-60 quando cultivadas por pelo menos 100 dias nas condições controle e

15 sobre o substrato MEF etanol.

- *Quanto à diferenciação em corpos embrióides:*

As figuras 3A e 3B representam fotomicrografias em campo claro (escala 100µm) de corpos embrióides formados a partir de células H9 cultivadas sobre uma condição controle

20 (A) e no substrato MEF etanol (B) aqui descrito.

Conforme pode ser observado no gráfico 3C, o diâmetro dos corpos embrióides formados não foi alterado ao se comparar as condições controle e MEF etanol.

Assim, comprova-se que as células-tronco pluripotentes

25 humanas mantêm sua capacidade de diferenciação em corpos embrióides quando cultivadas no substrato MEF etanol.

- *Quanto ao nível de ácido siálico:*

A figura 4 ilustra graficamente a quantificação de imunomarcação do ácido siálico Neu5Gc por citometria das

30 células-tronco pluripotentes.

Conforme pode ser observado, as células H9 cultivadas sobre a condições controle apresentam mais células positivas (38%) para Neu5Gc do que as células H9 cultivadas sobre o substrato MEF etanol (29%).

5 Além disso, fibroblastos embrionários murinos (MEF) foram utilizados como controle positivo do experimento e apresentaram 64% de células positivas.

Isso significa que as células-tronco pluripotentes humanas da linhagem H9 mantidas sobre o substrato MEF
10 etanol apresentaram menores níveis do ácido siálico não-humano Neu5Gc.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a obtenção de um substrato de cultivo para células-tronco pluripotentes caracterizado por compreender as etapas de:

a) rinsar as placas de petri com uma solução 0,1% de gelatina estéril e colocá-las abertas em fluxo laminar até a secagem;

b) preparar o meio de cultivo dos fibroblastos;

c) plaquear os fibroblastos nas placas e incubá-los a 37°C em 5% CO₂ por 48 horas;

d) rinsar as placas com água estéril;

e) aspirar a água e aplicar o mesmo volume de uma solução alcoólica, deixando-a tampada em fluxo laminar por 5 minutos à temperatura ambiente;

f) aspirar a solução alcoólica e rinsar novamente a placa com a solução;

g) aspirar e secar a placa destampada em fluxo laminar por 5 a 10 minutos;

h) armazenar a placa ou plaqueá-la.

2. Processo, conforme definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a solução alcoólica é preferencialmente etanol 70%.

3. Processo, conforme definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o armazenamento da placa é feito por selagem da mesma com parafilm ou em embalagem estéril.

3. Processo, conforme definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o armazenamento da placa é feito por acondicionamento da mesma a 4°C por até 2 meses ou a temperatura ambiente por até 1 semana.

3. Processo, conforme definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a placa ainda pode ser armazenada por períodos mais longos se acondicionada com solução de etanol 70% a -20°C.

4. Substrato de cultivo para células-tronco pluripotentes caracterizado pelo fato de que é produzido pelo processo conforme em qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3.

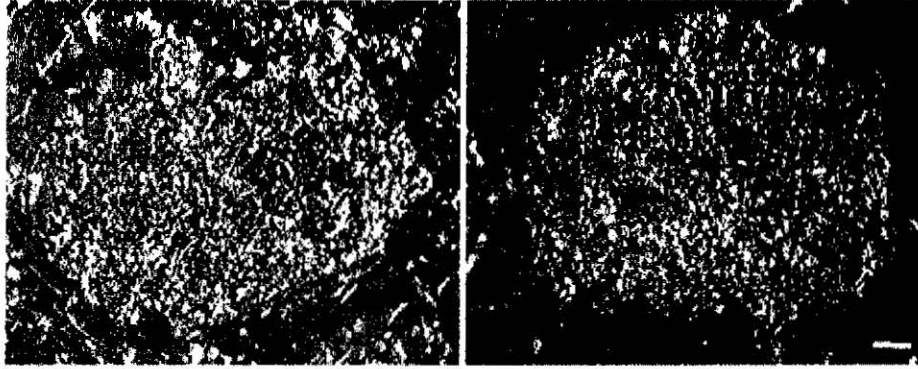


FIGURA 1A

FIGURA 1B

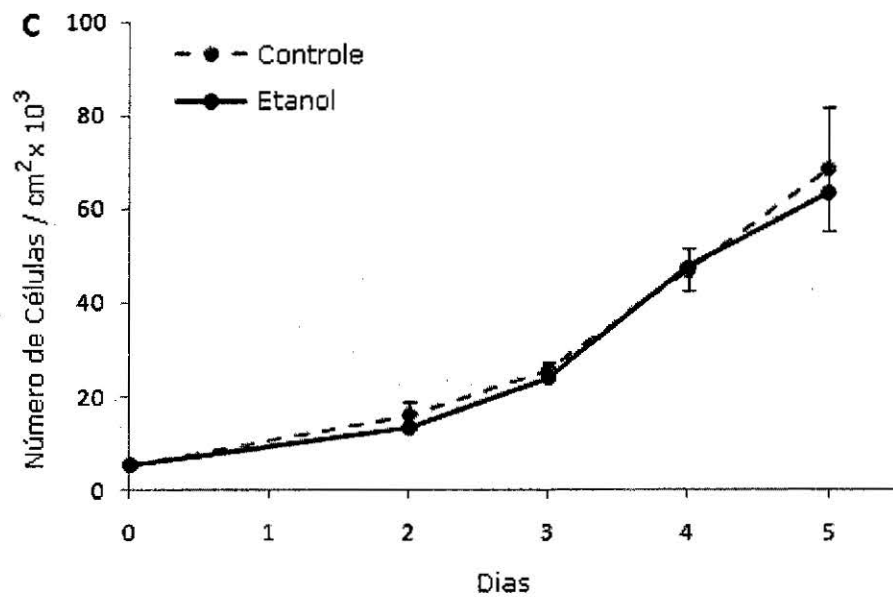


FIGURA 1C

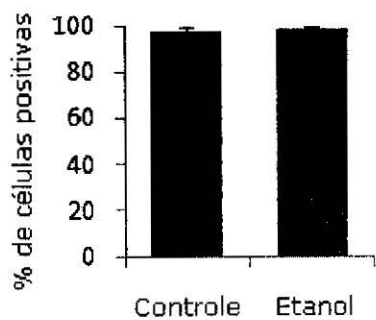


FIGURA 2A

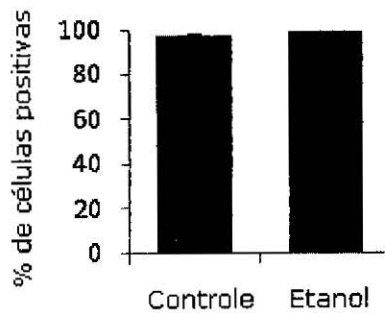


FIGURA 2B

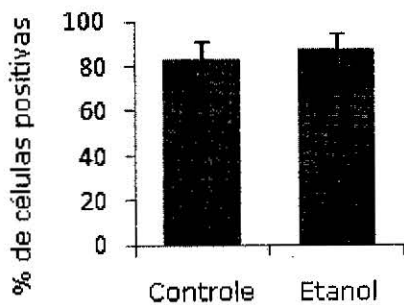


FIGURA 2C

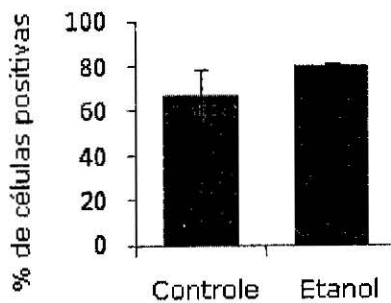


FIGURA 2D

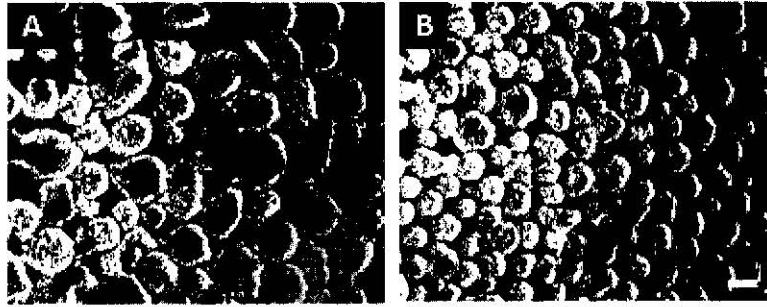


FIGURA 3A

FIGURA 3B

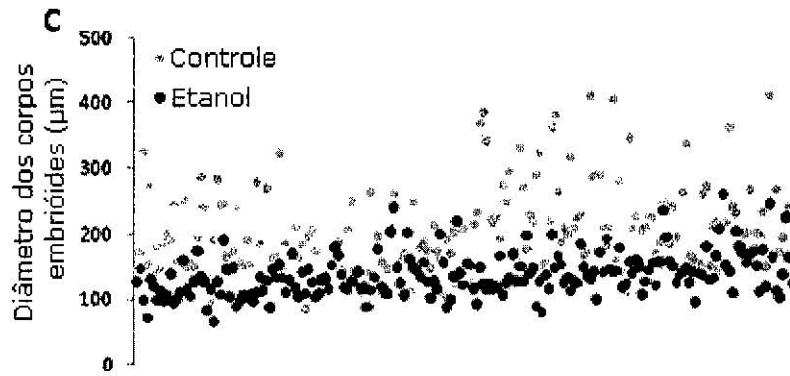


FIGURA 3C

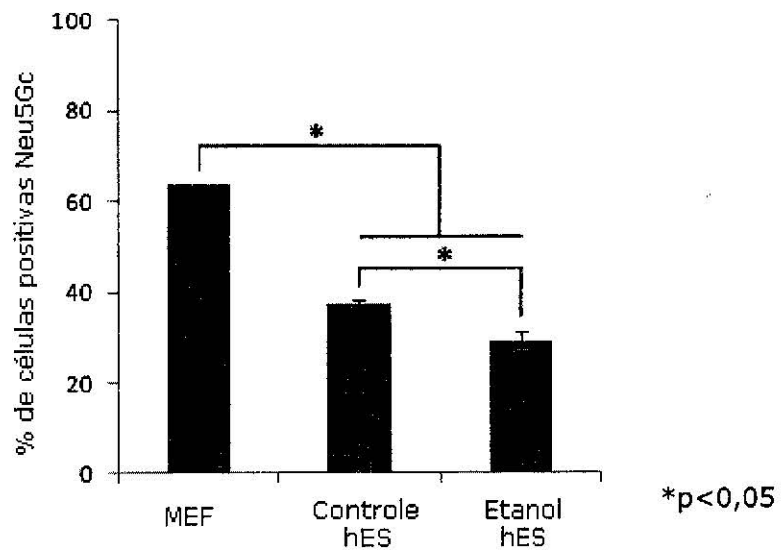


FIGURA 4

Resumo

**PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE UM SUBSTRATO DE CULTIVO PARA
CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES E SUBSTRATO DE CULTIVO
PRODUZIDO PELO MESMO**

5 O presente pedido de patente de invenção compreende um
substrato para o cultivo de células-tronco pluripotentes, o
qual é gerado a partir da fixação por etanol de células de
fibroblastos fetais de camundongo, e o processo de obtenção
do mesmo. A invenção tem o objetivo de estabelecer um
10 substrato com a complexidade necessária para garantir pelo
menos 95% das células mantidas pluripotentes. Além disso, o
uso de camadas de células alimentadoras é substituído, as
condições de cultivo são mantidas e a contaminação com
moléculas animais pela matriz é eliminada, sendo um
15 substrato de baixo custo e compatível com a demanda
científica nacional.