



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102018005449-0 A2



(22) Data do Depósito: 20/03/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 08/10/2019

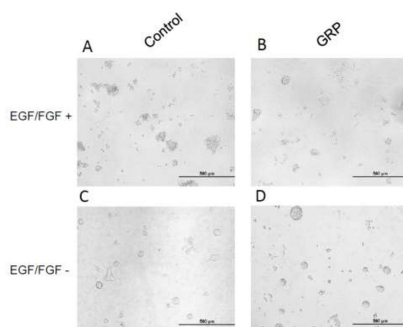
(54) **Título:** PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA CELULAR PARA A EXPANSÃO DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS, MEIO, MÉTODO DE EXPANSÃO DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS E USO DE UM PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA

(51) **Int. Cl.:** C12N 5/095; C12N 5/00; C12N 5/02.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.

(72) **Inventor(es):** MAURO MIGUEL MASIERO; MARIANE DA CUNHA JAEGER; GILBERTO SCHWARTSMANN; CAROLINE BRUNETTO DE FARIAS; RAFAEL ROESLER.

(57) **Resumo:** PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA CELULAR PARA A EXPANSÃO DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS, MEIO, MÉTODO DE EXPANSÃO DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS E USO DE UM PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA. A presente invenção descreve um método e meio de cultura, baseado no uso de peptídeo liberador de gastrina (gastrin-releasing peptide, GRP) como único fator de crescimento, com capacidade de expandir tumoresferas (estruturas enriquecidas em células-tronco tumorais) em cultura de forma tão eficaz quanto um meio contendo bFGF e EGF. Especificamente, a invenção propõe a simplificação da composição de meios e métodos de cultura de células-tronco tumorais com eficiência equivalente à dos métodos atualmente disponíveis e meios de cultura disponíveis comercialmente, sendo uma vantagem da invenção a utilização de apenas um fator de crescimento como princípio biologicamente ativo de meios de cultura. A presente invenção se situa nos campos da biologia celular, biologia molecular e biotecnologia aplicada à saúde e oncologia experimental.



### **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

## PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA CELULAR PARA A EXPANSÃO DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS, MEIO, MÉTODO DE EXPANSÃO DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS E USO DE UM PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA

### **Campo da Invenção**

**[0001]** A presente invenção descreve sobre um método e meio de cultura para a expansão de células tronca, baseado na utilização do peptídeo liberador de gastrina. A presente invenção se situa nos campos da biologia celular, biologia molecular e biotecnologia aplicada à saúde e oncologia experimental.

### **Antecedentes da Invenção**

**[0002]** A capacidade de produzir células-tronco tumorais em culturas em laboratório é atualmente uma importante ferramenta na área de oncologia experimental. Diferentes meios de cultura disponíveis comercialmente e protocolos de cultivo são utilizados, tipicamente utilizando uma combinação de diferentes proteínas recombinantes que atuam como fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento de fibroblastos básico (basic fibroblast growth factor, bFGF) e o fator de crescimento epidérmico (epidermal growth factor, EGF).

**[0003]** Os fatores de crescimento utilizados atualmente para indução de células-tronco incluem o bFGF e o EGF. Células neurais que expressam bFGF ou sofrem tratamento com bFGF exógeno apresentam características de divisão assimétrica, capacidade de diferenciação em diversos tecidos, entre outros, o que as caracterizam como células-tronco. Recentemente, bFGF e EGF vêm sendo usados como suplementos em meios de cultura celulares para criação, obtenção e/ou manutenção células-tronco tumorais, visto que se têm forte evidência de que vias de sinalização utilizadas na manutenção do estado de célula-tronco também tem um papel no desenvolvimento tumoral, e isso tem

o potencial de impulsionar a pesquisa em câncer tanto como fez com pesquisa com células-tronco. Desvantagens na utilização do bFGF e EGF incluem alto custo para a produção e a necessidade de combinar pelo menos duas proteínas. Portanto, a descoberta de fatores de crescimento ou substâncias análogas que promovam a características de um estado tronco em células tumorais, reduzindo o número de fatores necessários, podem representar redução de custo e aumento da eficiência.

**[0004]** O método descrito por Nör et al. (2013) para a formação de tumoresferas consiste na dissociação de células em superfície aderente com 0.25% de tripsina/EDTA, lavagem com HBSS para remoção do soro fetal bovino (SFB), e ressuspensão em DMEM/F12. O meio DMEM/F12 sem SFB foi suplementado com fatores 20 ng/mL de EGF e 20 ng/mL de bFGF, 1X suplemento B-27, 0.5X suplemento N-2, 50 ug e 50 ug/mL de albumina sérica bovina. Esse meio mantém a limitação de necessidade de combinação de diferentes fatores de crescimento para geração de células-tronco tumorais.

**[0005]** Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

**[0006]** O documento US20160145580A1 descreve um método para cultivar a população de células-tronco tumorais, que envolve a introdução dessas células sobre ou no substrato de cultura celular e cultura das células, em que o substrato de cultura celular está na forma de gel que inclui conjugado de glicosaminoglicano e fenalquilamina substituída.

**[0007]** O documento WO2016020572A1 descreve um meio de cultura de células para isolar e/ou enriquecer células-tronco tumorais, produzido por: (a) semeadura de células estaminais mesenquimais (MSCs) em placa, recipiente ou frasco para células em crescimento usando meio de cultura adequado; (b) remover opcionalmente qualquer meio restante e/ou soro do meio de cultura do passo (a) por lavagem; (c) adicionar meio sem soro bovino fetal (FBS); (d) recolhendo o meio de cultura do passo (c) e adicionando novo meio; (e) repetir

o passo (d) até que as células em cultura alcancem uma confluência de 80-90%; e (f) opcionalmente filtragem e congelação do meio.

**[0008]** Os documentos JP2014057572 e US20150079626 descrevem sobre um método de obtenção de células-tronco tumorais a partir do cultivo de células pluripotentes induzidas (iPSs) na presença de um sobrenadante de cultura de células tumorais.

**[0009]** O documento WO2015199088 descreve a produção de células-tronco tumorais envolvendo o fator de introdução que compreende o fator Oct3/4, Sox2 e Klf4, ou ácidos nucleicos que codificam o mesmo, em células cancerígenas, e cultivando as células em condições diferentes das condições de cultivo de manutenção de células embrionárias.

**[0010]** Na avaliação do estado da arte relacionado à invenção, há várias patentes anteriores que descrevem e reivindicam o uso de métodos e meios de cultura de células-tronco tumorais. No entanto, diferentemente da presente invenção, não há descrição ou reivindicação anterior de meio de cultura contendo GRP ou utilizando o GRP como fator de crescimento.

**[0011]** Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

**[0012]** É uma desvantagem técnica dos métodos comuns para produção de células-tronco tumorais a necessidade do emprego de combinações de fatores existentes nos métodos e de meios disponíveis. Dessa forma, torna-se uma solução para esta carência o desenvolvimento e produção de novos e mais simples métodos e meios de cultivo de células-tronco tumorais, baseados no uso de um único fator de crescimento.

### **Sumário da Invenção**

**[0013]** Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir da simplificação da

composição de meios e métodos de cultura de células-tronco tumorais com eficiência equivalente à dos métodos atualmente disponíveis e meios de cultura disponíveis comercialmente. É uma vantagem técnica da invenção a utilização de apenas um fator de crescimento como princípio biologicamente ativo de meios de cultura.

**[0014]** A presente invenção descreve um método e meio de cultura, baseado no uso de peptídeo liberador de gastrina (*gastrin-releasing peptide*, GRP) como único fator de crescimento, com capacidade de expandir tumoresferas (estruturas enriquecidas em células-tronco tumorais) em cultura de forma tão eficaz quanto um meio contendo bFGF e EGF.

**[0015]** Em um primeiro objeto, a invenção descreve sobre um processo de produção de um meio para a expansão de células-tronco tumorais, contendo a etapa (a) de fabricação do meio para meio de cultivo celular para células de mamíferos;

e por compreender uma etapa (b) de adição ao meio obtido na etapa (a) de pelo menos um fator de crescimento, selecionado entre o peptídeo liberador de gastrina (GRP) na concentração de 0,01 a 10.000 nM.

**[0016]** Em um segundo objeto a invenção refere-se a um meio de cultura celular para a expansão de células-tronco tumorais, compreendendo pelo menos um fator de crescimento selecionado entre GRP em uma quantidade de 0,0002 a 2% de GRP em relação ao peso total do meio como aditivo para cultivo de células-troncos tumorais.

**[0017]** Dessa forma, em um terceiro objeto a presente invenção descreve um método de expansão de células-tronco tumorais compreendo as seguintes etapas:

a) crescimento de células tumorais humanas em meio de cultura, conforme definido no segundo objeto, em que o meio deve ser adicionado quando houver sinais de acidificação até as células atingirem a confluência;

b) ao término da etapa (a) as células são tripsinizadas com uma mistura de tripsina/EDTA e centrifugadas até a formação de um *pellet*;

c) ao término da etapa (b), o sobrenadante é desprezado e o pellet ressuspenso em um meio conforme definido no segundo objeto;

d) as células são cultivadas por um período de sob as mesmas condições utilizadas na etapa (a), com a adição de um novo meio quando houver sinais de acidificação até as células atingirem confluência.

**[0018]** Em um quarto objeto, a invenção refere-se ao uso de um peptídeo liberador de gastrina em meio de cultura de células-tronco tumorais como um fator de crescimento para a expansão de células-tronco tumorais.

**[0019]** Ainda, o conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados é a utilização do peptídeo liberador de gastrina (GPR) com capacidade de expandir turmoesferas, no intuito de se obter um meio e/ou um método com uma maior simplificação da composição dos meios métodos de culturas de células-troncos tumorais atualmente disponíveis, mantendo a eficiência equivalente.

**[0020]** Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

### **Breve Descrição das Figuras**

**[0021]** Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente, são apresentadas as presentes figuras:

**[0022]** A figura 1 mostra a fotomicrografia de tumoresferas de meduloblastoma enriquecidas em CTMB após 6 dias de expansão. (A) controle, (B) exposição a GRP (100 nM) na presença dos fatores de crescimento EGF e bFGF, ou (C) exposição a GRP na ausência de EGF e bFGF.

**[0023]** A figura 2 mostra a quantificação com uso de ImageJ do número e do tamanho das tumoresferas obtidas. O número (A) e tamanho (B) das esferas foram analisados com a presença dos fatores bFGF e EGF, ou na sua

ausência (C) e (D), respectivamente. O resultado obtido com meio contendo GRP (100 nM) foi comparado ao controle (N = 3); \* p < 0,038.

**[0024]** A figura 3 mostra a comparação do tamanho das tumoresferas obtidas com a adição dos fatores bFGF e EGF, em relação ao meio com tratamento com GRP (100 nM) e controle sem adição de fatores.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

**[0025]** A presente invenção proporciona um método e meio de cultura eficiente para expansão de células-tronco tumorais, sem necessidade de adição dos fatores de crescimento utilizados atualmente, tipicamente bFGF e EGF, utilizando pela primeira vez o GRP como único fator de crescimento.

**[0026]** Na presente invenção, o termo “tumoresferas” pode ser definido como uma população de células derivadas de cultura celular ou de tumores primários que tenham características celulares e de marcadores de células-tronco tumorais, entre esses a capacidade de expansão em condições de cultivo celular não aderentes, a expressão de marcadores de indiferenciação (SOX2, Oct4, Nanog, etc.) e capacidade de gerar tumores quando implantadas em animais experimentais

**[0027]** A expressão “capacidade de expandir turmoesferas” pode ser compreendido na presente invenção como o meio de cultivo celular *in vitro* contendo o GRP como fator de crescimento, e que tenha a capacidade de gerar agregados celulares com características de células-tronco, e cuja finalidade é a utilização destas células em experimentos relacionados ao avanço na pesquisa na oncologia biomédica e clínica.

**[0028]** O “peptídeo liberador de gastrina” também apresentado pela sigla “GRP (do inglês *gastrin-releasing peptide*), pode ser definido como um peptídeo agonista do receptor GRPR. O GRP é um neuropeptídeo endógeno, homólogo à bombesina. O peptídeo GRP é derivado do transcrito do gene *GRP*, localizado no cromossomo 18. Brevemente, o transcrito é traduzido em uma polipeptídeo chamado pre-pró GRP, com 148 aminoácidos. Esse

polipeptídeo é processado enzimaticamente, perdendo 23 aminoácidos e formando o GRP<sub>1-125</sub>. Um outro processo enzimático por uma carboxypeptidase remove 30 aminoácidos na porção N-terminal, o que gera o proGRP<sub>31-125</sub> e proGRP<sub>1-27</sub>. O proGRP<sub>1-27</sub> sofre uma transaminação na porção C-terminal, formando o GRP<sub>1-27 amina</sub>, e uma clivagem na arginina 17 por uma endopeptidase forma o GRP<sub>18-28 amina</sub>.

**[0029]** O meio DMEM/Low Glicose pode ser melhor compreendido na presente invenção como um meio de cultivo celular para células de mamíferos, cuja formulação foi adaptada do meio *Eagle's minimum essential medium* (EMEM) e foi usado para a manutenção da cultura celular D283. A fórmula utilizada foi comercializada pela Gibco, Grand Island, United States of America, e contém baixos níveis de glicose (1 g/L) similares aos do meio EMEM.

**[0030]** O meio DMEM/F12 pode ser melhor compreendido na presente invenção como um meio de cultivo celular cuja formulação básica é a mesma do DMEM, porém com a adição de suplementos caracterizados pela mistura 1:1 do meio DMEM e do meio F12 de Ham.

**[0031]** Para fins melhor representação da invenção e não limitativos, na presente invenção foram utilizadas as células da linhagem comercial D283 de meduloblastoma humano cultivadas em frascos de 25 cm<sup>2</sup>, formando uma monocamada aderente na superfície em contato com o meio de cultura.

**[0032]** A presente invenção demonstra que a utilização de GRP possibilita em um aumento do tamanho da tumoresferas formadas em relação a não utilização de GRP. Estas características técnicas podem ser mais bem visualizadas nas figuras, onde o aumento do tamanho da tumoresferas é comparado quando utilizado o GRP e o controle sem uso de fatores. Nas figuras é demonstrado possibilidade de substituição dos meios de culturas utilizados tradicionalmente por um meio com GRP como único fator de crescimento, com potencial aplicação tecnológica e comercial nas áreas de biotecnologia e oncologia experimental, particularmente para o desenvolvimento de métodos de cultivo de células.



**[0033]** Dessa forma, a presente invenção descreve sobre um meio de cultura celular contendo pelo menos um fator de crescimento, sendo ele GRP. Adicionalmente, o meio descrito na presente invenção também poderia ser combinado com outros fatores de crescimento além do GRP, como o bFGF e EGF, porém isso faz-se desnecessário já que a suplementação com GRP permitiu o crescimento de tumoresferas. Análogos sintéticos do GRP poderão ter o mesmo efeito biológico, juntamente mediadores da via de sinalização celular por GRPR. Entretanto, essas combinações de fatores de crescimento, foge a principal vantagem da invenção que é a simplificação no meio e método de cultivo de células-tronco tumorais.

**[0034]** Para fins da presente invenção, a concentração de GRP a ser utilizado no meio de cultura pode variar, uma vez que cada linhagem apresenta uma curva de crescimento específica. Dessa forma, cada linhagem celular que fará uso deste meio de cultura contendo pelo menos um fator de crescimento GRP deverá ter a sua concentração otimizada. Portanto, não é possível estabelecer uma faixa de concentração de GRP ideal, quando não específica para uma determinada linhagem celular em cultura de células tronco tumorais.

**[0035]** Em um primeiro objeto, a invenção descreve sobre um processo de produção de um meio para a expansão de células-tronco tumorais, contendo a etapa (a) de fabricação do meio para meio de cultivo celular para células de mamíferos;

e por compreender uma etapa (b) de adição ao meio obtido na etapa (a) de pelo menos um fator de crescimento, selecionado entre o peptídeo liberador de gastrina (GRP) na concentração de 0,01 a 10.000 nM.

**[0036]** Em uma concretização do primeiro objeto, a etapa (b) consiste na adição ao meio obtido na etapa (a) de um peptídeo liberador de gastrina (GRP) na concentração de 0,01 a 10.000 nM

**[0037]** Em outra concretização, o meio utilizado na etapa (a) é um meio contendo os componentes: glicina 18,75 mg/ml; L-alanina 4,45 mg/ml; hidrocloreto de L-arginine 147,5 mg/ml; L-asparagina-H<sub>2</sub>O 7,5 mg/ml; ácido L-

aspártico; 6,65 mg/ml; hidrocloreto de L-cisteína -H<sub>2</sub>O 17,56 mg/ml; L-cistina 2HCl 31,29 mg/ml; ácido L-glutâmico 7.35 mg/ml; L-glutamina 365,0 mg/ml; hidrocloreto de L-histidina-H<sub>2</sub>O 31,48 mg/ml; L-isoleucina 54,47 mg/ml; L-leucina 59.05 mg/ml; hidrocloreto de L-lisina 91,25 mg/ml; L-metionina 17,24 mg/ml; L-fenilalanina 35.48 mg/ml; L-prolina 17,25 mg/ml; L-serina 26,25 mg/ml; L-treonina 53,45 mg/ml; L-triptofano 9,02 mg/ml; dihidrato de dissódio de L-tirosina 55,79 mg/ml; L-valine 52,85 mg/ml; biotina 0.0035 mg/ml; cloreto de colina 8,98 mg/ml; pantonato de D-cálcio 2,24 mg/ml; ácido fólico 2,65 mg/ml; niacinamida 2,02 mg/ml; hidrocloreto de piridoxina 2,013 mg/ml; riboflavina 0,219 mg/ml; hidrocloreto de tiamina 2,17 mg/ml; vitamina B12 0,68 mg/ml; i-inositol 12,6 mg/ml; cloreto de cálcio 116,6 mg/ml; sulfato de cúprico (CuSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O) 0,0013 mg/ml; nitrato férrico (Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O) 0.05 mg/ml; sulfato férrico (FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O) 0.417 mg/ml; cloreto de magnésio 28,64 mg/ml; sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) 48,84 mg/ml; cloreto de potássio (KCl) 311,8 mg/ml; bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) 2438,0 mg/ml; cloreto de sódio (NaCl) 6995,5 mg/ml; fosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 71,02 mg/ml; fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O) 62,5 mg/ml; sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O) 0,432 mg/ml; D-glicose (Dextrose) 3151,0 mg/ml; hipoxantina 2,39 mg/ml; ácido linoleico 0,042 mg/ml; ácido lipoico 0,105 mg/ml; vermelho de fenol 8,1 mg/ml; putrecina 0,081 mg/ml; piruvato de sódio 55,0 mg/ml; timidina 0,365 mg/ml,

em que o meio deverá ser processo em condições estéreis e filtrado, de forma a ser próprio para cultura celular;

em que o meio deverá ser testado para endotoxinas, de forma a ser próprio para cultura celular.

**[0038]** O processo descrito no primeiro objeto deverá respeitar características individuais de cada suplemento adicionado nas etapas, para assegurar a preservação das substâncias.

**[0039]** Em um segundo objeto a invenção refere-se a um meio de cultura celular para a expansão de células-tronco tumorais, compreendendo pelo

menos um fator de crescimento selecionado entre GRP em uma quantidade de 0,0002 a 2% de GRP em relação ao peso total do meio como aditivo para cultivo de células-troncos tumorais.

**[0040]** Em uma concretização do segundo aspecto, o meio utilizado refere-se a um meio contendo os seguintes componentes: glicina 18,75 mg/ml; L-alanina 4,45 mg/ml; hidrocloreto de L-arginine 147,5 mg/ml; L-asparagina-H<sub>2</sub>O 7,5 mg/ml; ácido L-aspártico; 6,65 mg/ml; hidrocloreto de L-cisteína -H<sub>2</sub>O 17,56 mg/ml; L-cistina 2HCl 31,29 mg/ml; ácido L-glutâmico 7.35 mg/ml; L-glutamina 365,0 mg/ml; hidrocloreto de L-histidina-H<sub>2</sub>O 31,48 mg/ml; L-isoleucina 54,47 mg/ml; L-leucina 59.05 mg/ml; hidrocloreto de L-lisina 91,25 mg/ml; L-metionina 17,24 mg/ml; L-fenilalanina 35.48 mg/ml; L-prolina 17,25 mg/ml; L-serina 26,25 mg/ml; L-treonina 53,45 mg/ml; L-triptofano 9,02 mg/ml; dihidrato de dissódio de L-tirosina 55,79 mg/ml; L-valine 52,85 mg/ml; biotina 0.0035 mg/ml; cloreto de colina 8,98 mg/ml; pantonato de D-cálcio 2,24 mg/ml; ácido fólico 2,65 mg/ml; niacinamida 2,02 mg/ml; hidrocloreto de piridoxina 2,013 mg/ml; riboflavina 0,219 mg/ml; hidrocloreto de tiamina 2,17 mg/ml; vitamina B12 0,68 mg/ml; i-inositol 12,6 mg/ml; cloreto de cálcio 116,6 mg/ml; sulfato de cúprico (CuSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O) 0,0013 mg/ml; nitrato férrico (Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O) 0.05 mg/ml; sulfato férrico (FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O) 0.417 mg/ml; cloreto de magnésio 28,64 mg/ml; sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) 48,84 mg/ml; cloreto de potássio (KCl) 311,8 mg/ml; bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) 2438,0 mg/ml; cloreto de sódio (NaCl) 6995,5 mg/ml; fosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 71,02 mg/ml; fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O) 62,5 mg/ml; sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O) 0,432 mg/ml; D-glicose (Dextrose) 3151,0 mg/ml; hipoxantina 2,39 mg/ml; ácido linoleico 0,042 mg/ml; ácido lipoico 0,105 mg/ml; vermelho de fenol 8,1 mg/ml; putrecina 0,081 mg/ml; piruvato de sódio 55,0 mg/ml; timidina 0,365 mg/ml,

em que o dito meio contém de 0,0002 a 2 % de GRP de peptídeo liberador de gastrina como aditivo para cultivo de células-troncos tumorais.

**[0041]** Os ensaios realizados na presente invenção demonstram a

eficácia de um meio de cultura contendo como único fator de crescimento o peptídeo liberador de gastrina (GRP, do inglês *gastrin-releasing peptide*) na expansão de células-tronco de tumores cerebrais, foi utilizada a linhagem celular D283 de meduloblastoma humano, conforme técnica de cultivo descrita previamente por Nör et al. (2013), além das modificações e inovações introduzidas nesta patente.

**[0042]** Ainda, foi realizada uma modificação inédita no protocolo descrito por Nör et al. (2013), ou seja, a retirada do fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês *epidermal growth factor*, 20 ng/mL) e do fator de crescimento de fibroblasto (FGF, do inglês, *fibroblast growth factor*, 20 ng/mL). O crescimento das neuroesferas enriquecidas em células-tronco de meduloblastoma (CTMB) foi comparado no meio descrito por Nör et al. (2013) e no meio modificado sem os fatores de crescimento EGF e FGF e contendo apenas GRP.

**[0043]** Para fins da presente invenção, é válido ressaltar que os valores de condição de cultura variam de acordo com cada tipo de célula a ser cultivada. Dessa forma, em um método de expansão de células-tronco tumorais, utilizando o meio descrito no segundo objeto, deve apresentar condições mais efetivas para determinado tipo de célula. Exemplos não exaustivos de condições que variam de acordo com o tipo de cada célula são temperatura e a concentração de CO<sub>2</sub>.

**[0044]** Dessa forma, em um terceiro objeto a presente invenção descreve um método de expansão de células-tronco tumorais compreendendo as seguintes etapas:

a) crescimento de células tumorais humanas em meio de cultura conforme definido no segundo objeto, em que o meio deve ser adicionado quando houver sinais de acidificação até as células atingirem a confluência;

b) ao término da etapa (a) as células são tripsinizadas com uma mistura de tripsina/EDTA e centrifugadas até a formação de um *pellet*;

c) ao término da etapa (b), o sobrenadante é desprezado e o *pellet* ressuspenso em um meio conforme definido no segundo objeto;

d) as células são cultivadas por um período de sob as mesmas condições utilizadas na etapa (a), com a adição de um novo meio quando houver sinais de acidificação até as células atingirem confluência.

**[0045]** A acidificação mencionada nas etapas (a) e (e) pode ser indicada pela alteração de cor do meio devido à presença de vermelho de fenol contido no mesmo.

**[0046]** Em uma concretização do terceiro objeto, o método envolve as etapas de:

a) crescimento de células tumorais humanas em meio de cultura, em uma incubadora com atmosfera de 0 a 10 % de CO<sub>2</sub>, com uma temperatura de 35 a 38 graus Celsius, com a adição de um meio conforme no segundo objeto, quando houver sinais de acidificação até as células atingirem a confluência;

b) ao término da etapa (a) as células são tripsinizadas com uma mistura de 0,25% de tripsina/EDTA e centrifugadas até a formação de um *pellet*;

c) ao término da etapa (b), o sobrenadante é desprezado e o *pellet* ressuspenso em meio conforme definido no segundo objeto;

d) as células são cultivadas em uma incubadora com as mesmas características da utilizada na etapa (a), com a adição de novo meio, conforme definido no segundo objeto, no terceiro dia, ou quando há sinais de acidificação; e

e) durante este período poderão ser feitas análises morfológicas ou moleculares para determinar possíveis variações perante tratamentos de interesse.

**[0047]** Nos ensaios realizados, após a realização do método foram evidenciadas neuroesferas com diversos tamanhos, conforme ilustrado na Figura 1. O número de esferas e o tamanho foram comparados, em relação ao controle, como mostrado na Figura 2. O uso de GRP aumentou o tamanho médio das esferas em 19% em relação ao controle no grupo com a adição dos fatores convencionais EGF e FGF (Figura 2B). No grupo sem a adição dos fatores EGF e FGF, houve aumento significativo de 31% no volume das

neuroesferas com exposição ao GRP (Figura 2D). A retirada do EGF e FGF levou a uma redução do tamanho das esferas, enquanto a substituição por GRP recupera este crescimento aos mesmos níveis das culturas tratadas com EGF e FGF (Figura 3). Esses resultados indicam pela primeira vez que o GRP tem a capacidade de induzir a expansão de células-tronco tumorais, e pode ser utilizado isoladamente como fator de crescimento para esse fim, substituindo a combinação tradicionalmente usada contendo EGF e FGF.

**[0048]** Dessa forma, em um quarto objeto, a invenção refere-se ao uso de um peptídeo liberador de gastrina em meio de cultura de células-tronco tumorais como um fator de crescimento para a expansão de células-tronco tumorais.

**[0049]** Em uma concretização do quarto objeto, a invenção refere-se ao uso de um peptídeo liberador de gastrina, como único fator de crescimento para expansão de células-troncos tumorais em meio de cultura de células troncos tumorais.

**[0050]** Em uma concretização do quarto objeto o uso do peptídeo liberador de gastrina é em meio DMEM/Low Glicose.

**[0051]** Entre as vantagens da invenção, destaca-se a características técnica da simplificação da composição de meios e métodos de cultura de células-tronco tumorais com eficiência equivalente à dos métodos atualmente disponíveis e meios de cultura disponíveis comercialmente.

**[0052]** A invenção tem potencial de comercialização para produção de meios de cultivo celular para uso experimental ou diagnóstico. Setores Industriais, Farmacêuticos, Médicos, Agronegócios. E setores de biotecnologia e saúde humana, farmacêutico e médico, particularmente empresas de biotecnologia que produzem e comercializam meios de cultura de células para uso experimental e diagnóstico.

### **Exemplos - Concretizações**

**[0053]** Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de

exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma. O objetivo de o experimento descrito a seguir com GRP 100nM é demonstrar que o GRP em si é capaz de induzir aumento do volume de tumoresferas em comparação ao meio com suplementação de EGF e FGF, e desta maneira substituir estes fatores.

**[0054]** As Células da linhagem celular comercial D283 foram cultivadas em frascos de 25 cm<sup>2</sup>, formando uma monocamada aderente na superfície em contato com o meio de cultura. O meio de cultura utilizado foi DMEM/Low Glicose, com a adição de 10% de soro fetal bovino. Quando as células atingiram a confluência, foram tripsinizadas, centrifugadas, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspensado em meio DMEM/F12.

**[0055]** Foi realizada uma modificação inédita no protocolo descrito por Nör et al. (2013), ou seja, a retirada do fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês *epidermal growth factor*, 20 ng/mL) e do fator de crescimento de fibroblasto (FGF, do inglês, *fibroblast growth factor*, 20 ng/mL). O crescimento das neuroesferas enriquecidas em células-tronco de meduloblastoma (CTMB) foi comparado no meio descrito por Nör et al. (2013) e no meio modificado sem os fatores de crescimento EGF e FGF e contendo apenas GRP.

**[0056]** Para padronizar o ensaio, foram utilizadas diferentes concentrações de células e diferentes tempos de incubação. Observamos que a concentração de 1.000 (mil) células por poço, no tempo de 6 (seis) dias, resultava na melhor obtenção de tumoresferas, e essa condição foi utilizada para a avaliação do meio contendo GRP. A concentração de GRP utilizada em todos os experimentos foi 100 nM. As células ressuspensas em DMEM/F12 foram plaqueadas em placas de 96 poços, na concentração de 1.000 (mil) células por poço, nas condições conforme descrito por Nör et al. (2013) ou no protocolo modificado.

**[0057]** O desenho experimental foi assim organizado: 10 poços de controle contendo EGF e FGF; 10 poços de controle sem EGF e FGF; 5 poços de tratamento com GRP combinado com EGF e FGF; e 5 poços de tratamento

com GRP na ausência de EGF e FGF, sendo cada poço com volume final de 100  $\mu$ L. Para garantir a viabilidade das neuroesferas, meio foi adicionado a cada dois dias. Portanto, no dia 3 foi adicionado em cada poço o volume final de 50  $\mu$ L e no dia 5, 100  $\mu$ L de meio de cultura DMEM/F12, com as diferentes combinações de presenças de EGF (20 ng/mL), FGF (20 ng/mL) e GRP (100 nM). Em todos os grupos os experimentos foram realizados em triplicata, e passaram pelas mesmas condições de temperatura, umidade do ar, e pH em uma incubadora com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e a 37°C.

**[0058]** No dia 6, foram evidenciadas neuroesferas com diversos tamanhos, conforme ilustrado na Figura 1. Através de um microscópio óptico foram realizadas fotomicrografias de 5 partes de cada poço: canto superior esquerdo, canto superior direito, canto inferior direito, canto inferior esquerdo e região central, permitindo que o tamanho médio e o número das neuroesferas fossem quantificados. Para quantificação foi utilizado o programa free-ware imageJ, sendo que a padronização de cada foto retirada foi realizada com uma barra gerada pelo microscópio, que possui 500  $\mu$ M. Esse procedimento permitiu criar uma relação de *pixels* por área, padronizando todas as imagens e resultados obtidos.

**[0059]** O número de esferas e o tamanho foram comparados, em relação ao controle, como mostrado na Figura 2. O uso de GRP aumentou o tamanho médio das esferas em 19% em relação ao controle no grupo com a adição dos fatores convencionais EGF e FGF (Figura 2B). No grupo sem a adição dos fatores EGF e FGF, houve aumento significativo de 31% no volume das neuroesferas com exposição ao GRP (Figura 2D). A retirada do EGF e FGF levou a uma redução do tamanho das esferas, enquanto a substituição por GRP recupera este crescimento aos mesmos níveis das culturas tratadas com EGF e FGF (Figura 3). Esses resultados indicam pela primeira vez que o GRP tem a capacidade de induzir a expansão de células-tronco tumorais, e pode ser utilizado isoladamente como fator de crescimento para esse fim, substituindo a combinação tradicionalmente usada contendo EGF e FGF.



**[0060]** Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

**Referência**

**[0061]** Nör C., Sassi, F.A., de Farias, C.B., Schwartzmann, G., Abujamra, A.L., Lenz, G., Brunetto, A.L., Roesler, R. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate promotes cell death and differentiation and reduces neurosphere formation in human medulloblastoma cells. *Molecular Neurobiology* 2013; 48:533-543.

### **Reivindicações**

1. Processo de produção de um meio de cultura celular para a expansão de células-tronco tumorais contendo a etapa: (a) de fabricação do meio para meio de cultivo celular para células de mamíferos;

e **caracterizado por** conter uma etapa (b) compreendendo a adição ao meio obtido na etapa (a) de pelo menos um fator de crescimento, selecionado entre o peptídeo liberador de gastrina (GRP) na concentração de 0,01 a 10.000 nM.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a etapa (b) consistir na adição ser de 0,01 a 10.000nM de peptídeo liberador de gastrina em meio fabricado na etapa (a).

3. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 2, **caracterizado por** o meio utilizado na etapa (a) é um meio contendo os componentes: glicina 18,75 mg/ml; L-alanina 4,45 mg/ml; hidrocloreto de L-arginine 147,5 mg/ml; L-asparagina-H<sub>2</sub>O 7,5 mg/ml; ácido L-aspártico; 6,65 mg/ml; hidrocloreto de L-cisteína -H<sub>2</sub>O 17,56 mg/ml; L-cistina 2HCl 31,29 mg/ml; ácido L-glutâmico 7.35 mg/ml; L-glutamina 365,0 mg/ml; hidrocloreto de L-histidina-H<sub>2</sub>O 31,48 mg/ml; L-isoleucina 54,47 mg/ml; L-leucina 59.05 mg/ml; hidrocloreto de L-lisina 91,25 mg/ml; L-metionina 17,24 mg/ml; L-fenilalanina 35.48 mg/ml; L-prolina 17,25 mg/ml; L-serina 26,25 mg/ml; L-treonina 53,45 mg/ml; L-triptofano 9,02 mg/ml; dihidrato de dissódio de L-tirosina 55,79 mg/ml; L-valine 52,85 mg/ml; biotina 0.0035 mg/ml; cloreto de colina 8,98 mg/ml; pantonato de D-cálcio 2,24 mg/ml; ácido fólico 2,65 mg/ml; niacinamida 2,02 mg/ml; hidrocloreto de piridoxina 2,013 mg/ml; riboflavina 0,219 mg/ml; hidrocloreto de tiamina 2,17 mg/ml; vitamina B12 0,68 mg/ml; i-inositol 12,6 mg/ml; cloreto de cálcio 116,6 mg/ml; sulfato de cúprico (CuSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O) 0,0013 mg/ml; nitrato férrico (Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>"9H<sub>2</sub>O) 0.05 mg/ml; sulfato férrico (FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O) 0.417 mg/ml; cloreto de magnésio 28,64 mg/ml; sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) 48,84 mg/ml; cloreto de potássio (KCl) 311,8 mg/ml; bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) 2438,0 mg/ml; cloreto de sódio (NaCl) 6995,5

mg/ml; fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 71,02 mg/ml; fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ ) 62,5 mg/ml; sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4\text{-7H}_2\text{O}$ ) 0,432 mg/ml; D-glicose (Dextrose) 3151,0 mg/ml; hipoxantina 2,39 mg/ml; ácido linoleico 0,042 mg/ml; ácido lipoico 0,105 mg/ml; vermelho de fenol 8,1 mg/ml; putrecina 0,081 mg/ml; piruvato de sódio 55,0 mg/ml; timidina 0,365 mg/ml,

em que o meio deverá ser preparado em condições estéreis e filtrado, de forma a ser próprio para cultura celular;

em que o meio deverá ser testado para endotoxinas, de forma a ser próprio para cultura celular.

4. Meio de cultura celular para a expansão de células-tronco tumorais, **caracterizado por** compreender pelo menos um fator de crescimento selecionado entre GRP em uma quantidade de 0,0002 a 2% de GRP em relação ao peso total do meio como aditivo para cultivo de células-troncos tumorais.

5. Meio de cultura, de acordo com reivindicação 4, **caracterizado por** o meio utilizado refere-se a um meio contendo os seguintes componentes: glicina 18,75 mg/ml; L-alanina 4,45 mg/ml; hidrocloreto de L-arginine 147,5 mg/ml; L-asparagina- $\text{H}_2\text{O}$  7,5 mg/ml; ácido L-aspártico; 6,65 mg/ml; hidrocloreto de L-cisteína - $\text{H}_2\text{O}$  17,56 mg/ml; L-cistina  $2\text{HCl}$  31,29 mg/ml; ácido L-glutâmico 7.35 mg/ml; L-glutamina 365,0 mg/ml; hidrocloreto de L-histidina- $\text{H}_2\text{O}$  31,48 mg/ml; L-isoleucina 54,47 mg/ml; L-leucina 59.05 mg/ml; hidrocloreto de L-lisina 91,25 mg/ml; L-metionina 17,24 mg/ml; L-fenilalanina 35.48 mg/ml; L-prolina 17,25 mg/ml; L-serina 26,25 mg/ml; L-treonina 53,45 mg/ml; L-triptofano 9,02 mg/ml; dihidrato de dissódio de L-tirosina 55,79 mg/ml; L-valine 52,85 mg/ml; biotina 0.0035 mg/ml; cloreto de colina 8,98 mg/ml; pantonato de D-cálcio 2,24 mg/ml; ácido fólico 2,65 mg/ml; niacinamida 2,02 mg/ml; hidrocloreto de piridoxina 2,013 mg/ml; riboflavina 0,219 mg/ml; hidrocloreto de tiamina 2,17 mg/ml; vitamina B12 0,68 mg/ml; i-inositol 12,6 mg/ml; cloreto de cálcio 116,6 mg/ml; sulfato de cúprico ( $\text{CuSO}_4\text{-5H}_2\text{O}$ ) 0,0013 mg/ml; nitrato férrico ( $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3\text{-9H}_2\text{O}$ ) 0.05 mg/ml; sulfato férrico

(FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O) 0.417 mg/ml; cloreto de magnésio 28,64 mg/ml; sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) 48,84 mg/ml; cloreto de potássio (KCl) 311,8 mg/ml; bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) 2438,0 mg/ml; cloreto de sódio (NaCl) 6995,5 mg/ml; fosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 71,02 mg/ml; fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O) 62,5 mg/ml; sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O) 0,432 mg/ml; D-glicose (Dextrose) 3151,0 mg/ml; hipoxantina 2,39 mg/ml; ácido linoleico 0,042 mg/ml; ácido lipoico 0,105 mg/ml; vermelho de fenol 8,1 mg/ml; putrecina 0,081 mg/ml; piruvato de sódio 55,0 mg/ml; timidina 0,365 mg/ml,

em que o dito meio contém de 0,0002 a 2 % de GRP de peptídeo liberador de gastrina como aditivo para cultivo de células-troncos tumorais.

6. Método de expansão de células-tronco tumorais **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

a) crescimento de células tumorais humanas em meio de cultura conforme definido nas reivindicações de 4 a 5, em que o meio deve ser adicionado quando houver sinais de acidificação até as células atingirem a confluência;

b) ao término da etapa (a) as células são tripsinizadas com uma mistura de tripsina/EDTA e centrifugadas até a formação de um *pellet*;

c) ao término da etapa (b), o sobrenadante é desprezado e o *pellet* ressuspenso em um meio, conforme definido nas reivindicações 4 e 5;

d) as células são cultivadas por um período de sob as mesmas condições utilizadas na etapa (a), com a adição de um novo meio quando houver sinais de acidificação até as células atingirem confluência.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado por** envolver as etapas de:

a) crescimento de células tumorais humanas em meio de cultura, em uma incubadora com atmosfera de 0 a 10 % de CO<sub>2</sub>, com uma temperatura de 35 a 38 graus Celsius, com a adição de um meio conforme definido nas reivindicações 4 e 5, quando houver sinais de acidificação até as células atingirem a confluência;

b) ao término da etapa (a) as células são tripsinizadas com uma mistura de 0,25% de tripsina/EDTA e centrifugadas até a formação de um *pellet*;

c) ao término da etapa (b), o sobrenadante é desprezado e o pellet ressuspenso em meio conforme definido nas reivindicações 4 e 5;

d) as células são cultivadas em uma incubadora com as mesmas características da utilizada na etapa (a), com a adição de novo meio, conforme definido nas reivindicações 4 e 5, no terceiro dia, ou quando há sinais de acidificação; e

e) durante este período poderão ser feitas análises morfológicas ou moleculares para determinar possíveis variações perante tratamentos de interesse.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 6 a 7, **caracterizado por** os sinais de acidificação ser indicado pela alteração de cor do meio devido a presença de um indicador de pH, por exemplo, vermelho de fenol.

9. Uso de um peptídeo liberador de gastrina em meio de cultura de células-tronco tumorais **caracterizado por** ser como um fator de crescimento para a expansão de células-troncos tumorais.

10. Uso, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado por** o peptídeo liberador de gastrina ser o único fator de crescimento para expansão de células-troncos tumorais em um meio de cultura conforme definido nas reivindicações 4 e 5.

**FIGURAS**

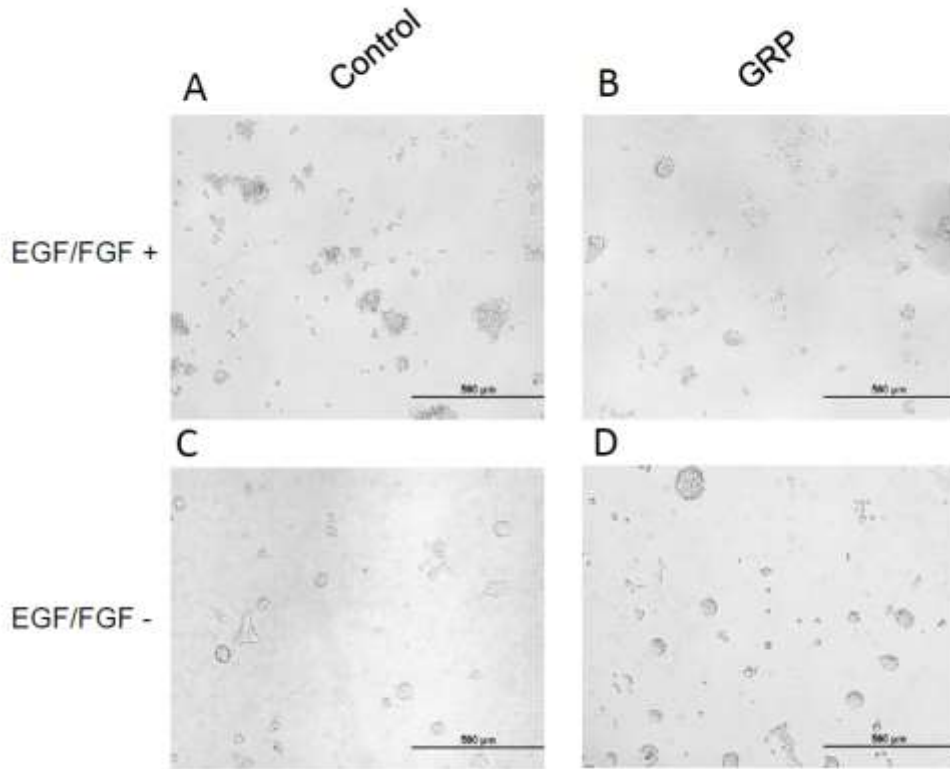


Figura 1

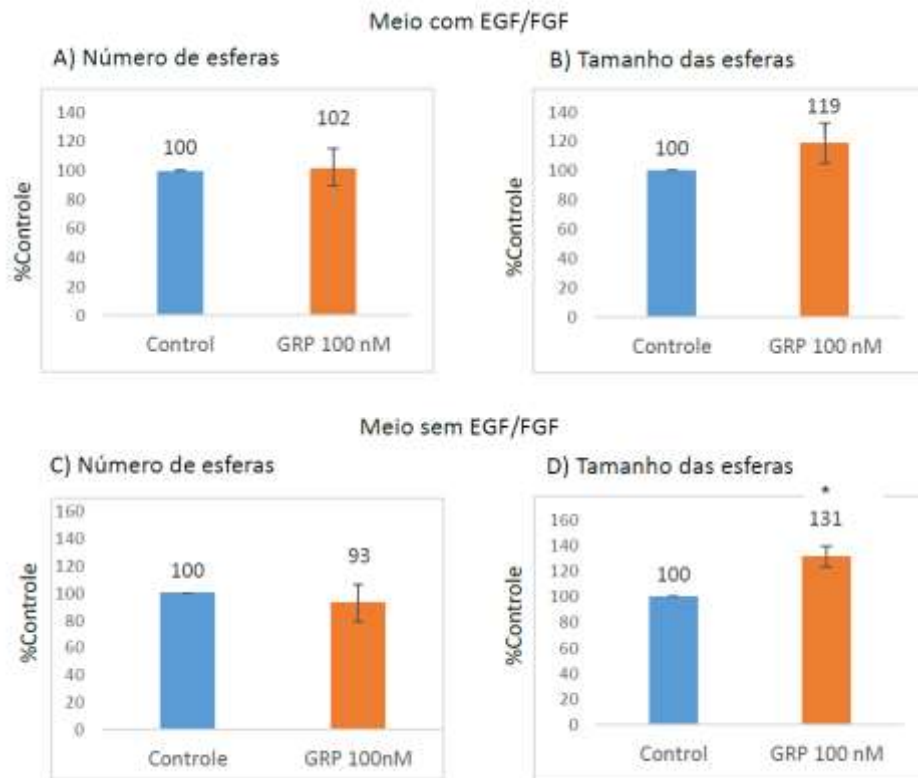


Figura 2

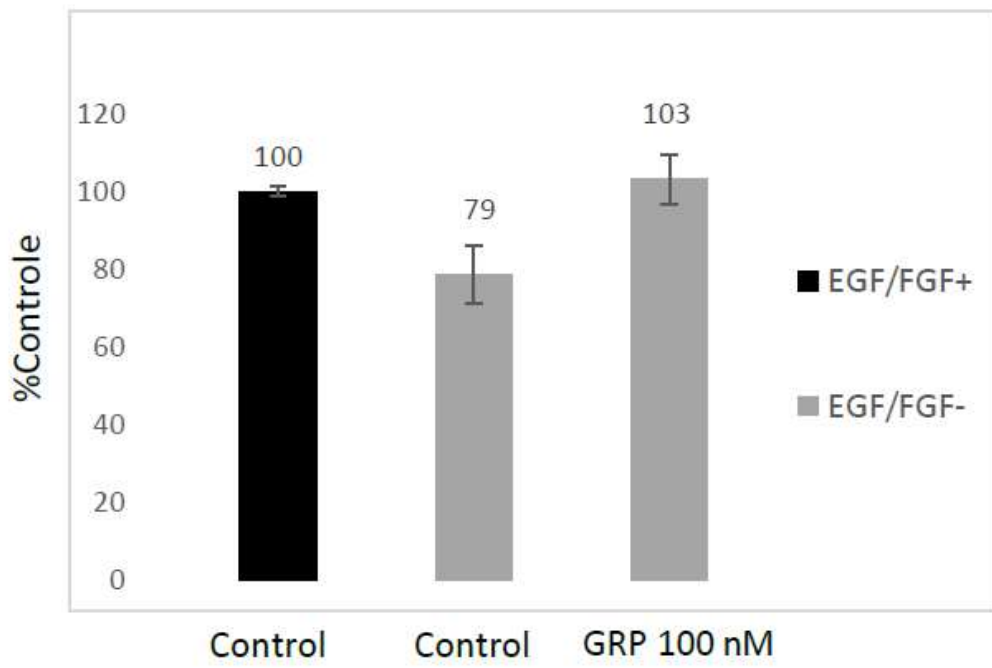


Figura 3



**Resumo****PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA CELULAR PARA A  
EXPANSÃO DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS, MEIO, MÉTODO DE  
EXPANSÃO DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS E USO DE UM PEPTÍDEO  
LIBERADOR DE GASTRINA**

A presente invenção descreve um método e meio de cultura, baseado no uso de peptídeo liberador de gastrina (gastrin-releasing peptide, GRP) como único fator de crescimento, com capacidade de expandir tumoresferas (estruturas enriquecidas em células-tronco tumorais) em cultura de forma tão eficaz quanto um meio contendo bFGF e EGF. Especificamente, a invenção propõe a simplificação da composição de meios e métodos de cultura de células-tronco tumorais com eficiência equivalente à dos métodos atualmente disponíveis e meios de cultura disponíveis comercialmente, sendo uma vantagem da invenção a utilização de apenas um fator de crescimento como princípio biologicamente ativo de meios de cultura. A presente invenção se situa nos campos da biologia celular, biologia molecular e biotecnologia aplicada à saúde e oncologia experimental.