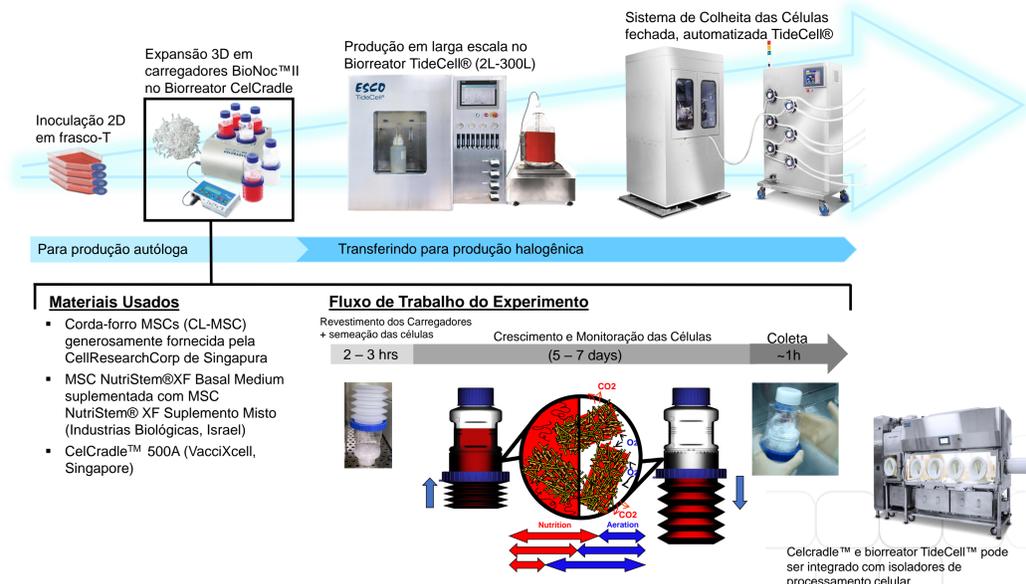


INTRODUCTION

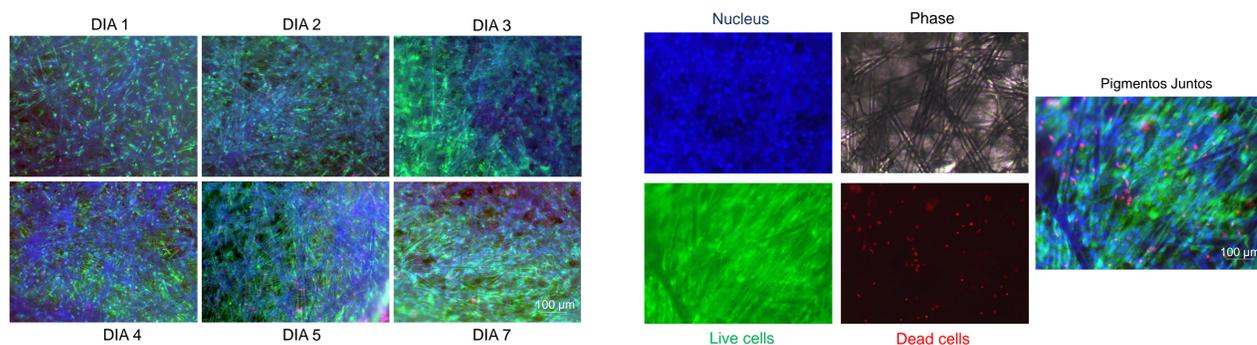
As células-tronco mesenquimiais humanas (CTMs) receberam grande interesse médico como uma nova opção de tratamento e estimularam uma nova era na medicina regenerativa. No entanto, o cultivo convencional em vasos de plástico e em suspensões dificulta o aumento da produção de MSCs para aplicações clínicas. Para superar esses desafios, a Esco Aster aproveitou os biorreatores da Tide Motion (movimento da maré) para desenvolver uma operação de bioprocessamento escalável para a produção de MSCs em Boas Práticas de fabricação (BPF). processo compatível. MSCs humanas isoladas de doadores saudáveis foram expandidas em culturas aderentes 2D convencionais por algumas passagens antes de serem semeadas em macrocarreadores (BioNOC™ II) em um Garrafa CelCradle™. As células foram cultivadas em meios quimicamente definidos e foram obtidas eficiências de colheita de mais de 90%, com viabilidades celulares superiores a 85% após 5-7 dias em cultivo. De acordo com a Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT), os critérios de controle e liberação de qualidade para MSCs caracterizados por seus marcadores de superfície e multipotência (diferenciações adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas) asseguraram mais de 95% das MSCs em cultivo. É importante ressaltar que as MSCs cultivadas no BioNOC™ II apresentaram características in vivo semelhantes, com secreções de proteínas extracelulares da matriz (ECM) e alterações morfológicas fibroblásticas. Nosso processo atual é robusto, contando com ferramentas de bioprocessamento padrão na maioria das instalações de fabricação sob contrato (CMOs). Através do monitoramento e otimização dos principais parâmetros do processo, como pH, taxas de consumo de glicose, pretendemos transferir facilmente a produção em escala laboratorial de P & D acadêmico / industrial em escala de bancada / escala piloto de ensaios clínicos e produção comercial.

PROCESS DEVELOPMENT



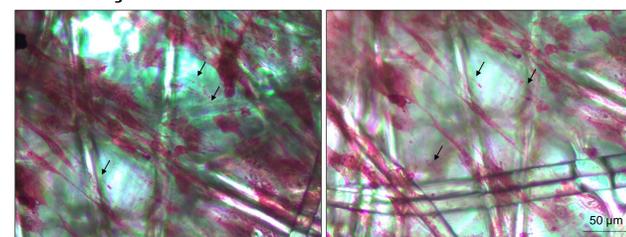
RESULTADOS

MONITORAÇÃO E EXPANÇÕES DAS MSCs NO CELCRADLE™

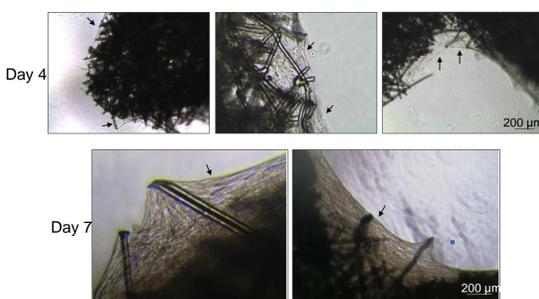


FORMAÇÃO ECM

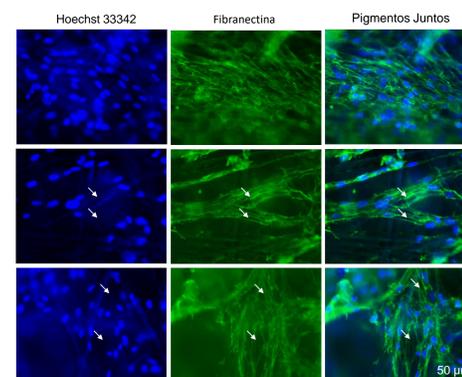
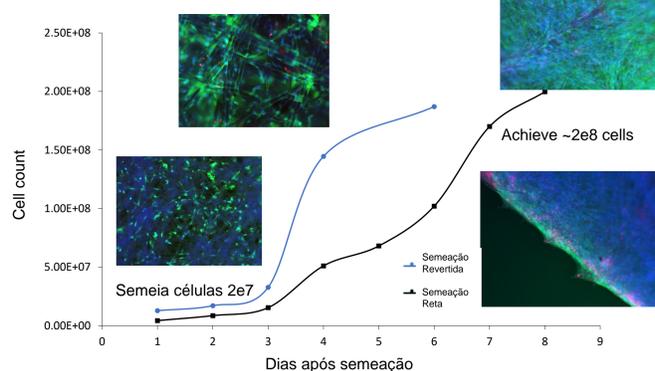
Junção da Rede ECM Fibril na BioNoc™ 3D



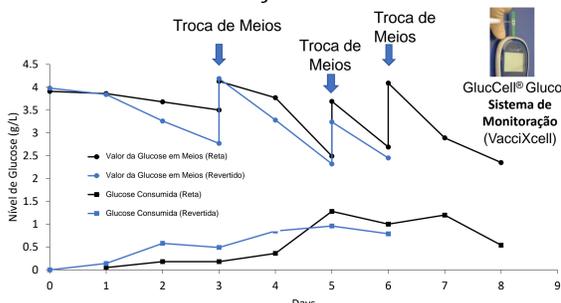
Alta Confluências de MSCs em BioNoc™ II



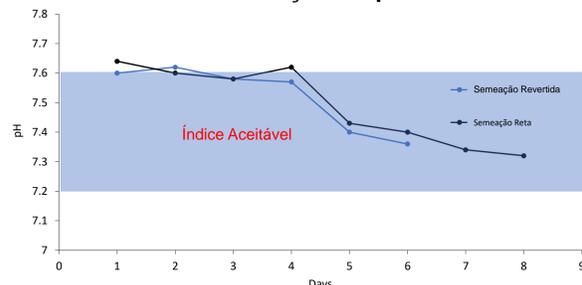
Crescimento Celular no CelCradle



Consumição de Glucose



Monitoração do pH



COLETA CELULAR

| Enzimas | Accumax™ | Collagenase | TrypLE™ Express | Trypsin | Esco Aster Mistura de Enzimas |
|-----------------|----------|-------------|-----------------|---------|-------------------------------|
| Coleta (%) | 87 | 68.3 | 78.3 | 56.3 | 91.8 |
| Viabilidade (%) | 95.6 | 73.2 | 95.8 | 88.9 | 93.5 |

Depois da Coleta

Accumax Collagenase TrypLE Express Trypsin Esco Aster Enzyme Mix

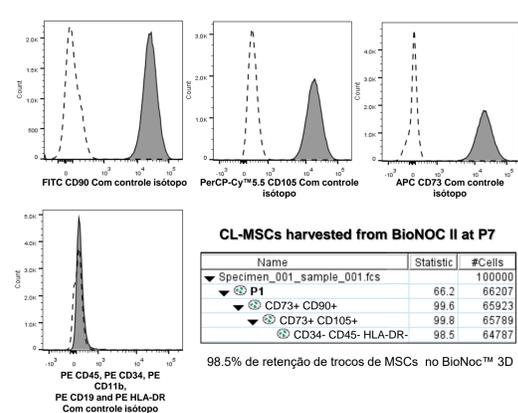
Células colhidas em placas 2D

Accumax Collagenase TrypLE Express Trypsin 2D culture

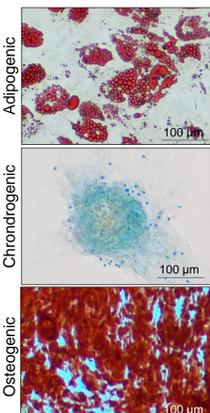
Eficiência de coleta varia para diferentes tipos de células-tronco e cocktail de enzimas usadas

CONTROLE DE QUALIDADE E CRITERIO DE SOLTURA

Identidade Celular



Multipotência



CONCLUSÃO

- > Biorreator de Uso único com cama-fixa, de fácil transferência de banco para escala industrial
- > Operações de carregamento de muda simplificado
- > Processo de expansão de MSCs em concordância para Boas Práticas de Fabricação Atual (Current Good Manufacturing Practices- cGMP)

| Fator/Atributo | Desempenho das MSCs |
|--|--|
| Agarramento Celular | Alta eficiência de sementeira >90% Revestimento de Fibras de nectina para meios sem sêrum (adequado pra produção cGMP) |
| Crescimento Celular e Monitoração | Fácil visualização das células em matrix através das manchas tingidas Confluência alcançada no dia 5-8 Controle e monitoração dos parâmetros do processo |
| Coleta Celular | >90% das células colhidas com enzimas patenteados Esco Aster |
| Secreção ECM | Fibranectina e colágenos observados Mais relevante para condições in vitro com crescimento 3D |
| Qualidade da Célula | Sem tronco e trilineagem diferenciação de MSCs preservada Viabilidade de coleta >90%, com células saudáveis obtidas depois da coleta. |

Comparação de Cultivos 2D vs 3D para CL-MSCs @P6

| | 2D Culture Flask | 3D BioNOC™ II |
|-------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Morfologia Celular | Polyhedral | Spindle shaped, fibroblastic like |
| Densidade Celular | 2.5 million / T75 flask | 2e8 cells / CelCradle™ |
| Uso De Meios | 15 ml | 500 ml |
| Número Celular: uso de meios | 166,000 cells : 1 ml | 400,000 cells : 1ml |
| Para obter 2e8 células | 80 T75 flasks with 1200 ml media | 1 CelCradle™ with 500 ml media |
| % de retenção sem troncos | 79% | 98% |

MSCs são capazes de alcançar ~10 vezes expansão de dobras no CelCradle™

*Atualmente sementeira entre 2-3e7 células por CelCradle™ para obter 2e8 células
Projetado para obter 4e9 células em 2L TideCell® e 9e12 células em 300L TideCell®

*Densidade final poderá varia de acordo com a idades, fonte da célula tronco e tipo de meio usado