

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2007.10.04	(73) Titular(es): LABORATÓRIO MEDINFAR - PRODUTOS FARMACÊUTICOS, S.A.
(30) Prioridade(s):	RUA MANUEL RIBEIRO DE PAIVA, Nº 1, 1º 2700-547 AMADORA PT
(43) Data de publicação do pedido: 2008.01.09	
(45) Data e BPI da concessão: 2008.08.04 157/2008	(72) Inventor(es): RITA ISABEL GANCHAS SOARES PT MARIA CONSTANÇA BAPTISTA COELHO PT JORGE MIGUEL SILVA SANTOS PT JOSÉ PAULO MARTINS PT VERA ALEXANDRA BASTO PT
	(74) Mandatário:

(54) Epígrafe: **MÉTODO DE ISOLAMENTO DE CÉLULAS PRECURSORAS A PARTIR DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM MÉTODO OPTIMIZADO E DEFINIDO DE ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DE CÉLULAS PRECURSORAS, A PARTIR DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO. PARA ALÉM DE SER REPRODUTÍVEL E 100% EFICAZ, EM TERMOS DE NÚMERO DE AMOSTRAS PROCESSADAS, O PRESENTE MÉTODO PERMITE ISOLAR UM ELEVADO NÚMERO, DEFINIDO, DE CÉLULAS COM CARACTERÍSTICAS PRECURSORAS, A SUA MAIORIA APÓS APENAS UMA FASE DE ADESÃO E EXPANSÃO/MULTIPLICAÇÃO EX VIVO (GARANTINDO ASSIM A SUA IDENTIDADE FENOTÍPICA), NUM INTERVALO DE TEMPO MAIS CURTO QUE OS ANTERIORMENTE DESCRITOS NO ESTADO DA ARTE. COM ESTE MÉTODO É POSSÍVEL OBTER, EM 9 DIAS, APÓS CONGELAÇÃO DIRECTA DUMA FRACÇÃO DAS CÉLULAS, E APÓS UMA FASE DE ADESÃO E EXPANSÃO/MULTIPLICAÇÃO EX VIVO (FINAL DE PO), DA MAIORIA DAS MESMAS, RENDIMENTOS NA ORDEM DAS $8,6(\pm 0,1) \times 10^5$ CÉLULAS/GRAMA DE CORDÃO UMBILICAL PROCESSADO. AS CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS PERMITEM, POR EXEMPLO, E AO FINAL DE 35 DIAS, OBTER UMA MÉDIA DE $7,7 \times 10^{15}$ CÉLULAS COM CARACTERÍSTICAS PRECURSORAS, A PARTIR DE 100% DAS AMOSTRAS DE CORDÃO UMBILICAL PROCESSADAS. O MÉTODO OBJECTO DA PRESENTE INVENÇÃO, POR SER SIMPLES, ROBUSTO, E 100% EFICAZ, PODE SER APLICADO SOB BOAS PRÁTICAS DE FABRICO (GMP) EM LABORATÓRIOS DE SERVIÇOS DEDICADOS À TERAPIA CELULAR EM HUMANOS. PARA ALÉM DISSO, O MÉTODO TEM APLICAÇÃO NAS ÁREAS FARMACÊUTICA, COSMÉTICA E DA BIOTECNOLOGIA.

RESUMO

"MÉTODO DE ISOLAMENTO DE CÉLULAS PRECURSORAS A PARTIR DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO"

A presente invenção refere-se a um método de isolamento de células precursoras, com capacidade de diferenciação noutro tipo de células, a partir do cordão umbilical humano.

Para além de ser 100% eficaz em termos de número de amostras bem sucedidas, o presente método permite isolar um número de células estaminais que viabilizam a criopreservação das mesmas após somente dois ciclos de multiplicação ex vivo, garantindo assim a sua identidade fenotípica. Com este método é possível obter, em 6 dias, e no final de P1, rendimentos na ordem das $1.3(\pm 0.1) \times 10^6$ células/grama de cordão umbilical processado.

O método objecto da presente invenção tem aplicação nas áreas clínica, farmacêutica, cosmética e da biotecnologia.

Lisboa, 3 de Outubro de 2007

DESCRIÇÃO

"MÉTODO OPTIMIZADO E DEFINIDO DE ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DE CÉLULAS PRECURSORAS A PARTIR DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO"

Domínio Técnico da Invenção

É objecto da presente invenção um método optimizado e definido de isolamento e preservação de células precursoras a partir do cordão umbilical humano.

No âmbito da presente invenção entende-se por "células precursoras" células capazes de aderirem e de se multiplicarem numa superfície e meio de cultura definidos, onde a maioria das células expressam os marcadores de superfície celular CD44, CD73, CD90 e CD105, e de igual forma a maioria das células apresenta apenas expressão residual dos marcadores de superfície celular CD14, CD31, CD34 e CD45, com capacidade de expansão que pode atingir os 18 ciclos de expansão/multiplicação, mantendo uma taxa de multiplicação de aproximadamente 1,7/24h e uma morfologia fibroblastóide constantes, e com capacidade de se diferenciarem parcial ou terminalmente noutro tipo de células, como sejam, comprovadamente, os osteoblastos, condrócitos, adipócitos, cardiomiócitos e células gliais.

O método objecto desta invenção vem adicionar ao estado da arte um método robusto, 100% eficaz, permitindo a obtenção de células precursoras a partir de todas as fracções de cordão umbilical processadas; e que proporciona rendimentos, em termos de número de células isoladas por

massa de cordão umbilical, relativamente ao tempo despendido, sem precedentes.

As inovações de teor técnico que são base desta invenção consistem fundamentalmente no aproveitamento do produto da reacção de digestão, que promove a dissociação das células a partir do tecido, em três fases independentes do processo de isolamento, para além da optimização duma série de características técnicas, até agora não descritas, ou descritas duma forma indefinida (não seleccionada), no estado da arte.

O método de recuperação tri-faseado baseia-se na recuperação das células dissociadas a partir de três origens independentes e duma forma sequencial ao longo do processo de isolamento 1- primeira fase: recuperação das células dissociadas que têm a capacidade de aderir à superfície do frasco de cultura celular onde é processada a digestão, ainda na presença da solução de digestão, 2- segunda fase: recuperação das células dissociadas, recolhidas a partir do sobrenadante duma centrifugação da solução de digestão após a primeira fase, que têm a capacidade de aderir à superfície de um frasco de cultura celular, numa solução vol/vol consistindo de sobrenadante e meio de cultura. 3- terceira fase: recuperação das células dissociadas, recolhidas a partir do sedimento da centrifugação da solução de digestão após a primeira fase, e que são congeladas directamente, sem passar por uma fase de adesão e expansão/multiplicação.

Quanto às características técnicas optimizadas, estas são: 1- tipo de manipulação mecânica e dimensão das fracções de tecido inicial a utilizar, 2- presença ou ausência de

coágulos de sangue nos vasos umbilicais, 3- a natureza, acção individual ou combinatória e concentração/ões da/s enzima/as a utilizar no passo de digestão do tecido, 4- composição da solução onde é processada a digestão enzimática do tecido, 5- evolução do pH ao longo da reacção de digestão, 6- período/tempo de incubação, 7- forma de agitação (suave ou vigorosa) durante o período de incubação, 8- tipo de ambiente de incubação (seco ou húmido), e 9- densidade celular durante a criopreservação.

A combinação dum processo baseado na criação dum aproveitamento tri-faseado das células dissociadas e na optimização dos aspectos técnicos acima mencionados gerou um método mais consentâneo com a sua utilização para fins de terapia baseada na administração de células estaminais, devido à sua robustez (100% de eficácia) e aos elevados rendimentos obtidos, em termos de número de células num relativamente curto espaço de tempo. Para além disso, a forma de criopreservação foi também optimizada para maximizar a viabilidade celular para uso futuro.

Com o método agora desenvolvido é possível obter, em 100% das amostras processadas, facto sem precedentes no estado da arte, e em nove dias, após congelação directo duma fracção das células, e após uma fase de adesão e expansão/multiplicação ex vivo (final de P0), da maioria das mesmas, rendimentos na ordem das $8,6(\pm 0,1) \times 10^5$ células/grama de cordão umbilical processado. Este rendimento representa a possibilidade de obter, a partir de um cordão umbilical (tendo em média 35cm), um total de $3,0 \times 10^9$ células. Por sua vez, as características das células permitem obter, por exemplo, em 35 dias (final de P6), uma média de $7,7 \times 10^{15}$ células, utilizando um inóculo

constante ao longo das 6 passagens de $5,0 \times 10^5$ células/cm², a partir de 100% das amostras de cordão umbilical processadas. No final, este rendimento representa uma redução de cerca de 20% do tempo necessário para obter o mesmo número de células com os protocolos semelhantes existentes no estado da arte. De acordo com o descrito anteriormente, e para atingir números próximos das $1,0 \times 10^{15}$ células, utilizando o mesmo inóculo inicial, seriam necessários no mínimo 80 dias (Harris et al., 2006; Can and Karahuseyinoglu, 2007).

O método visa a utilização das células isoladas para vários fins, sendo o primordial a terapia celular, mas podendo ser estendido à criação de bancos celulares, formas de terapia genética, composições farmacológicas, composições cosméticas, produção de moléculas ou compostos moleculares, produção de camadas de células de suporte para cultura ou para servir de base para gerar linhas celulares através da manipulação genética das células em questão.

Assim, as células obtidas através do presente método têm aplicações nas áreas clínica, farmacêutica, cosmética e da biotecnologia.

Antecedentes da Invenção

Uma célula precursora (estaminal, germinal, indiferenciada ou primitiva) é um tipo de célula com capacidade de auto-renovação durante um período de tempo significativo e, sobretudo, com capacidade de diferenciação parcial ou terminal noutro tipo de células, sendo que, a diferenciação parcial origina células com um grau de especialização mais

avançado, ainda com capacidade de diferenciação, enquanto que a diferenciação terminal origina células totalmente especializadas, sem capacidade de diferenciação.

Apesar do enorme potencial de diferenciação das células precursoras com origem embrionária, a sua utilização tem suscitado grande controvérsia com base não só em questões éticas graves mas também em questões de segurança.

Como tal, a investigação nesta área tem vindo a analisar a viabilidade de fontes alternativas não embrionárias, como sejam a medula óssea, perióstio, osso trabecular, tecido adiposo, região sinovial, músculo esquelético, dentes definitivos e epitélio da mucosa olfactiva (Barry and Murphy, 2004; Roisen et al., 2001). Foi já demonstrado que as células isoladas a partir destes tecidos têm capacidade de diferenciação *inter alia* em condrócitos, adipócitos, osteoblastos, mioblastos, cardiomiócitos, astrócitos e tenócitos *in vitro*, tendo já sido também diferenciadas *in vivo* (Carvalho et al., 2007; Majumdar et al., 1998 e Pittenger et al., 1999). A estas células precursoras, isoladas a partir de fontes não-embrionárias, e capazes de se diferenciarem em células de tecidos com natureza não-hematopoiética (outros tecidos que não o sanguíneo), derivados das três camadas germinativas (endoderme, mesoderme e ectoderme), chamamos de células da linhagem mesenquimal, ou mesenquimatosas.

É na prática clínica, nomeadamente na colheita, que surgem as principais limitações à utilização das células precursoras mesenquimatosas. A colheita destas células é invariavelmente feita através de métodos invasivos para o dador, normalmente através de procedimentos cirúrgicos que,

como por exemplo no caso da colheita de células da medula óssea, pode envolver anestesia geral. Para além disso, e por serem raras, o número de células obtidas é na maioria dos casos limitado.

Como alternativa, os tecidos umbilicais têm sido descritos como possíveis fontes de células precursoras (Romanov *et al.*, 2003). O sangue do cordão umbilical, por exemplo, é reconhecidamente uma fonte rica em células precursoras, mas maioritariamente da linhagem sanguínea (hematopoiética).

Dado que as células precursoras mesenquimatosas são bastante mais raras no sangue do cordão umbilical do que as células hematopoiéticas, tentativas de isolar estas células a partir deste tecido têm suscitado alguma frustração e mesmo os estudos mais bem sucedidos, com eficácias pouco acima dos 60%, relativas ao número total de amostras testadas, utilizaram quantidades limitativas de sangue. Ainda assim, a incerteza persistiu quanto à origem destas células, isto é, se seriam realmente originárias do sangue ou de qualquer outro tecido fetal (Chul-Wan *et al.*, 2003; Bieback *et al.*, 2004).

Outros registos descrevem o isolamento de células precursoras mesenquimatosas, não do sangue, mas a partir dos tecidos constituintes do próprio cordão umbilical, consideravelmente mais ricos nestas células que o tecido sanguíneo. Alguns exemplos destes procedimentos têm como base tecidos como a matriz do cordão umbilical, ou geleia de Wharton (Purchio *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006), a veia umbilical (Romanov *et al.*, 2003; Auger *et al.*, 2005), os tecidos arteriais (Kadner *et al.*, 2004), ou os tecidos de

revestimento, como seja a membrana amniótica (Phan *et al.*, 2004).

Uma observação ao pormenor revela que os protocolos descritos são, cada um à sua maneira, redutores no que concerne às características das células obtidas e vagos nos rendimentos conseguidos, perdendo-se sempre diversidade fenotípica das populações resultantes, principalmente devido ao desnecessário direccionamento para determinados tecidos constituintes do cordão umbilical, e permanecendo sempre uma incerteza quanto ao número concreto de células que se podem obter a partir dos mesmos.

Adicionalmente, nenhum destes métodos provou até hoje ser robusto ao ponto de apresentar eficácias muito elevadas, em termos de sucesso de isolamento de células a partir das amostras processadas, condição essencial para aplicação em protocolos clínicos onde, no caso do cordão umbilical, existe apenas uma oportunidade para se ser bem sucedido. Apesar das taxas de sucesso de isolamento de células mesenquimatosas a partir da matriz do cordão umbilical serem mais elevadas do que a partir do sangue do cordão umbilical, ou da medula óssea, não existe ainda nenhum método que defina uma taxa de sucesso específica, e muito menos que garanta o isolamento de células com as características e números suficientes em 100% das amostras processadas, característica essencial para aplicação na terapia celular (Deryl e Weiss, 2008).

Além do mais, a desnecessária introdução de complexos passos de remoção de estruturas, como sejam os vasos umbilicais (Purchio *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006), ou macerações

mecânicas (Seyda et al., 2006), faz com que os protocolos existentes sejam de difícil uniformização e reprodução, sendo que a excessiva manipulação dos tecidos poderá modificar o fenótipo das células precursoras a isolar, provocando algum grau de diferenciação indesejável (Gardner et al., 2000; Claes et al., 2002; Cullinane et al., 2003).

Assim, e por exemplo, o protocolo da Cell Research Corporation, que se foca unicamente na membrana amniótica, origina uma cultura de células precursoras já direccionadas apenas para a linhagem endotelial (Phan et al., 2004).

Também limitativos, são os protocolos que partem dos tecidos dos vasos umbilicais, implicando complexas extracções destas estruturas e cingindo-se também à obtenção de culturas com carácter endotelial e sub-endotelial (Romanov et al., 2003; Auger et al., 2005; Kadner et al., 2004; Sarugaser et al., 2005).

Finalmente, e não menos complexos, são os protocolos que se pretendem reduzir a porção de tecido inicial à matriz do cordão umbilical, ou Geleia de Wharton (Purchio et al., 1998; Mitchell et al., 2003; Davies et al., 2004; Wang et al., 2006). As próprias descrições publicadas por estes autores, que definem os seus protocolos como baseados unicamente na Geleia de Wharton, apresentam incongruências, contribuindo também eles para a falta de definição e critério das metodologias aplicadas. Assim, enquanto que Purchio et al., 1998; Mitchell et al., 2003; e Wang et al., 2006, recorrem a uma técnica que envolve complexas, e dificilmente reproduzíveis, remoções iniciais das artérias e veia umbilicais, utilizando depois a totalidade do tecido remanescente, Davies et al., 2004, também removem os vasos

umbilicais mas, ao contrário do que descrevem os autores anteriores, utilizam o tecido que permanece acoplado a estes como fonte de células precursoras mesenquimatosas. A discrepância de pontos de vista é injustificável, para além de que o excesso de manipulação dos tecidos existente em qualquer destes protocolos deixa antever efeitos indesejáveis na manutenção do fenótipo precursor pretendido, e consequentemente dificulta em muito a oferta alargada de serviços de isolamento e criopreservação de células mesenquimatosas à população em geral.

Ao estado da arte falta claramente adicionar um método cujo protocolo seja simples, robusto e definido, por forma a poder ser reproduzido com garantias de eficácia e eficiência. À medida que a utilização das células precursoras mesenquimatosas atinge a sua aplicabilidade na terapia celular, é preciso garantir ao paciente que o método utilizado para isolamento das células, que são neste caso o agente terapêutico, seja bem sucedido não só em termos de qualidade, mas também em quantidade. Dada a ausência de garantias apresentada pelos protocolos descritos até ao momento no estado da arte, crê-se que a presente invenção venha suprimir a carência dum método com estas características.

Descrição Geral da Invenção

A presente invenção pretende adicionar ao estado da arte um método de selecção para isolamento de células precursoras a partir do cordão umbilical humano, de carácter mesenquimatoso especificado, baseado na selecção de células através da digestão específica do colagénio, material de suporte da matriz do cordão umbilical (geleia de Wharton).

A libertação de células dá-se sem qualquer manipulação mecânica do tecido inicial, fazendo com que o fenótipo das células permaneça inalterado e a viabilidade celular seja mantida. Entenda-se por "manipulação mecânica", no âmbito desta invenção, a maceração e/ou esmagamento e/ou remoção de estruturas, como sejam os vasos umbilicais, ou qualquer outro efeito mecânico que possa interferir na estabilidade, e consequentemente no fenótipo e viabilidade das células constituintes dos tecidos umbilicais, mais precisamente dos tecidos constituintes das zonas sub-amniótica, intervacular e perivascular, que formam a matriz do cordão umbilical (geleia de Wharton).

Para além da ausência de manipulação mecânica, o aproveitamento do produto da reacção de digestão, que promove a dissociação das células a partir do tecido, em três fases independentes do processo de isolamento, e a optimização de vários outros parâmetros técnicos do método fazem com este seja simples, robusto, 100% eficaz, e produza elevados rendimentos em termos de número de células com relação ao tempo despendido. Todas estas características tornam o método passível de servir de base para serviços de terapia celular, como seja a criopreservação das células mesenquimatosas resultantes do isolamento para futuro uso autólogo.

O resultado da introdução dum processo de aproveitamento faseado, reduzindo ao máximo a perda de células ao longo do processo, e da optimização duma série de características técnicas, até agora descritas duma forma indefinida no estado da arte, foi avaliado a partir dos rendimentos em termos de número total de células obtidas. Estas correspondem, na totalidade, a uma porção menor congelada directamente na fase de vapor do azoto líquido, sem passar

por uma fase de adesão e expansão/multiplicação, e à maioria das células, isoladas a partir duma primeira fase de adesão, logo após a digestão, e duma segunda fase de adesão, logo após a centrifugação. Os dois últimos grupos foram assim sujeitos a expansão/multiplicação *ex vivo*, em meio de cultura, e contabilizados quando as respectivas culturas atingiram a confluência máxima (100%) no frasco de cultura de tecidos. Assim sendo, os dois últimos grupos foram criopreservados antes de se proceder a qualquer passagem (P), ou seja, no final de P0.

Entenda-se por passagem (P), no âmbito desta invenção, no reinóculo das células aderentes, após estas terem atingido confluência máxima durante a fase de adesão e expansão/multiplicação precedente, e após tripsinização para as libertar da superfície de adesão, aumentando simultaneamente a superfície de adesão e expansão celular, assim como do volume total do meio de cultura. Desta forma, dá-se início a uma nova fase de adesão e expansão/multiplicação, e conseqüente aumento do número de células aderentes *in vitro*. Com um mínimo de passagens (P) fica também garantida a identidade fenotípica das células isoladas, cuja probabilidade de sofrer alterações aumenta com o número de fases de adesão e expansão/multiplicação. Considera-se confluência máxima ao preenchimento uniforme, em por uma única camada de células, de toda a superfície dos suportes de cultura celular.

O método de recuperação tri-faseado baseia-se na recuperação das células dissociadas a partir de três origens independentes e duma forma sequencial ao longo do processo de isolamento 1- primeira fase: recuperação das células dissociadas que têm a capacidade de aderir à

superfície do frasco de cultura celular onde é processada a digestão, ainda na presença da solução de digestão, 2- segunda fase: recuperação das células dissociadas, recolhidas a partir do sobrenadante duma centrifugação da solução de digestão após a primeira fase, que têm a capacidade de aderir à superfície de um frasco de cultura celular, numa solução consistindo de sobrenadante e meio de cultura 3- terceira fase: recuperação das células dissociadas, recolhidas a partir do sedimento da centrifugação da solução de digestão após a primeira fase, e que são congeladas directamente, sem passar por qualquer fase de adesão e expansão/multiplicação.

Por sua vez, as características técnicas optimizadas foram:

1- Dimensão das fracções de tecido inicial a utilizar na reacção de digestão, mantendo constante uma relação proporcional definida, entre a massa de tecido (g), a superfície do fundo do recipiente onde assenta o tecido durante a digestão (cm^2), o volume de solução de digestão (ml), e o volume total do recipiente (cm^3), de aproximadamente, 1:2:2:37; tendo em consideração que, em média, uma fracção de 1cm de cordão umbilical humano pesa 1g. Assim, após retirada a membrana amniótica, foram comparados diversos tipos de fraccionamento transversal, consistindo de cortes num plano perpendicular ao eixo do cordão umbilical, produzindo um fraccionamento baixo/nulo (porções de 5cm - máximo comprimento processado), um fraccionamento médio (porções de 2,5cm), um fraccionamento elevado (porções de 0,3cm), e um fraccionamento milimétrico, reduzindo a fracção de 5cm inicial a porções milimétricas. Todos os fraccionamentos foram executados com o auxílio dum bisturi e as amostras processadas de igual

forma daí por diante. Concluiu-se que um fraccionamento médio, utilizando fracções com 2,5cm de comprimento, resultou em melhores rendimentos.

2- A presença ou ausência de coágulos de sangue dentro dos vasos umbilicais (1 veia e 2 artérias): é sabido que a hemoglobina pode ser tóxica e assim diminuir a viabilidade celular das células *in vitro*. Como tal, avaliaram-se os rendimentos obtidos através dum método onde os coágulos de sangue foram eliminados através de cortes longitudinais com um bisturi, infligidos por forma a causar uma abertura no vaso respectivo, a partir do qual o coágulo pôde ser eliminado. Este procedimento foi comparado com outro onde os coágulos permaneceram dentro dos vasos umbilicais, influenciando assim a viabilidade celular, e quando aplicado, a actividade enzimática nos passos subsequentes do método de isolamento. Conclui-se que os coágulos representavam uma taxa negativo, prejudicando claramente os rendimentos em termos de número de células viáveis obtidas.

3- A natureza, concentração, e a acção individual ou combinada da/s enzima/as a utilizar no passo de digestão do tecido: testou-se a adesão celular directa à superfície do frasco de cultura, na presença de meio de cultura, sem libertação assistida por uma digestão enzimática, em comparação com a libertação de células a partir da matriz do cordão umbilical assistida com uma única enzima: 0,0750% (p/v) de collagenase II ou 2,0% (p/v) de pronase. Dada a maior eficiência da collagenase II, testou-se então a acção conjunta da mesma com 0,125% (p/v) de tripsina (na presença e ausência de 0,260mM de Ácido etileno-diamino-tetra-acético - EDTA); a acção conjunta de 0,0750% (p/v) de collagenase II com 0,5% (p/v) de hialuronidase; e

finalmente, a acção conjunta de 0,0750% (p/v) de colagenase II, 2,0% (p/v) de pronase e 0,5% (p/v) de hialuronidase. Concluiu-se que a libertação assistida de células através da acção conjunta de 0,0750% (p/v) de colagenase II com 0,125% (p/v) de tripsina produz melhores rendimentos em termos de número de células obtidas por massa de tecido e unidade de tempo. Adicionalmente, variando a concentração da colagenase II (0,0375%, 0,0750%, 0,150% - p/v), concluiu-se ainda que a acção conjunta resulta melhor utilizando a colagenase II a uma concentração de 0,075% (p/v), mantendo a tripsina a uma concentração de 0,125% (p/v), na presença de 0,260mM EDTA, mantendo constantes as variáveis anteriormente optimizadas.

4- A composição da solução onde é processada a reacção de digestão enzimática: testaram-se várias composições da solução de digestão, nomeadamente Alpha-Mem, suplementado com 20% Soro fetal bovino (FBS), e 1% de penicilina/estreptomicina; solução tampão salina do tipo *Hanks* (HBSS), suplementada com 0,26mM EDTA; solução tampão salina do tipo *Hanks* (HBSS), suplementada com 5mM CaCl_2 ; solução de Ácido 4-(2-Hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES) 25mM, suplementada com 5mM CaCl_2 , e solução HEPES 25mM suplementada com 10mM CaCl_2 . Concluiu-se que a solução tampão salina do tipo *Hanks* (HBSS), suplementada com 0,260mM EDTA produziu os melhores rendimentos.

5- Monotorização do pH ao longo do processo de digestão: o pH foi monotorizado ao longo do processo de digestão, verificando-se que, em geral, dá-se uma acidificação do meio. Em média, e utilizando a combinação da colagenase II a uma concentração de 0,075% (p/v), com a tripsina a uma

concentração de 0,125% (p/v), numa solução salina do tipo *Hanks* (HBSS), suplementada com 0,260mM EDTA, o pH inicial foi de 7,2, passando para 6,4 após 4h de incubação, e 5.9 ao final de 16h. A acidificação do meio pode explicar a falta de eficiência no isolamento de células viáveis após longos períodos de incubação (16h) uma vez que, e apesar de ocorrerem digestões mais completas, a acidez do meio torna-se prejudicial para a viabilidade celular. O pH da solução de digestão é uma taxa importante e não deve baixar para valores inferiores a 6,4, com prejuízo na eficiência do método, contabilizado em termos de números de células viáveis isoladas.

6- O período/tempo de incubação da reacção enzimática de digestão: testaram-se vários períodos de incubação (2h, 4h, 6h e 16h). Conclui-se que 4h de incubação produziram os melhores rendimentos.

7-A forma de agitação (suave ou vigorosa) durante o período de incubação da reacção enzimática de digestão: a incubação foi feita num banho orbital com uma agitação suave ou vigorosa, consistindo de 100 e 140 oscilações por minuto (opm), respectivamente. A agitação suave, de 100 opm, produziu melhores rendimentos.

8- O ambiente de incubação da reacção enzimática de digestão (seco ou húmido): a incubação foi feita a 37°C, em dois ambientes diferentes. Para o efeito foi utilizado um agitador orbital de imersão, onde a dispersão/distribuição de calor foi feita através de água e ar húmido (derivada da evaporação e condensação), em comparação com uma câmara seca climatizada, onde a dispersão/distribuição de calor

foi feita através do ar. A incubação dentro da câmara seca climatizada resultou em melhores rendimentos.

9- O efeito da densidade celular na eficiência da criopreservação das células após uma fase de adesão e expansão/multiplicação: 1 ml das suspensões celulares obtidas no final de P0 foram congeladas na fase de vapor do azoto líquido a várias densidades (células/ml), numa solução de 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 90% Soro fetal bovino (FBS). As viabilidades após descongelação (% células viáveis/células totais congeladas em função da densidade de congelação) e a recuperação celular (% células viáveis recuperadas após descongelação / células viáveis inicialmente congeladas em função da densidade de congelação) foram determinadas. Os resultados indicam que 3×10^6 células/mL é a densidade que oferece maiores garantias de manutenção e recuperação de células viáveis durante e após o congelação, nas condições utilizadas.

Dadas as optimizações acima descritas, e duma forma geral, a invenção baseia-se num método seleccionado de isolamento de células precursoras, a partir do cordão umbilical humano, onde cada cordão umbilical é previamente escorrido de sangue e transportado para o laboratório em tampão salino contendo glucose e antibióticos, sempre em ambiente estéril, preferencialmente à temperatura ambiente se processado num período de 48h. Para períodos de armazenamento superiores aconselha-se uma temperatura entre 2 e 8°C.

Em seguida, o processamento do cordão umbilical e o isolamento das células precursoras, é efectuado em câmara

de fluxo laminar vertical, sob condições da máxima esterilidade.

No início do processamento, a membrana amniótica, estrutura de revestimento do órgão que esteve em contacto com o ar durante a recolha, e mais susceptível de ter sofrido contaminação microbiana durante os procedimentos do parto, é retirada e o cordão é lavado com uma nova solução salina.

Duma forma geral, para o isolamento das células pretendidas parte-se de fracções de dimensão definida, derivada dum fraccionamento de dimensão optimizada, que não envolve manipulação mecânica dos tecidos ou extracção de qualquer estrutura interna do órgão, mas apenas de coágulos sanguíneos quando estes existem dentro dos vasos umbilicais.

A libertação das células a partir do tecido é promovida por uma digestão enzimática direccionada à matriz do cordão umbilical, sendo importante respeitar uma relação proporcional definida, entre a massa de tecido (g), a superfície do fundo do recipiente onde está confinado o tecido durante a digestão (cm^2), o volume de solução digestão (ml), e o volume total do recipiente (cm^3), de aproximadamente, 1:2:2:37; tendo em consideração que, em média, uma fracção de 1cm de cordão umbilical humano pesa 1g.

Para proceder à digestão enzimática utiliza-se uma combinação específica de enzimas, a concentrações determinadas, numa solução com composição definida, e num tempo de incubação, pH mínimo, forma de agitação, e tipo de ambiente de incubação igualmente especificados.

A recuperação das células dissociadas do tecido processa-se numa forma faseada, sendo que primeiro se recuperam as células que têm a capacidade de aderir à superfície do frasco de cultura celular onde é processada a digestão, ainda na presença da solução de digestão, durante um período entre os 10 e os 120 minutos, preferencialmente 30 minutos, à temperatura e meio ambiente; numa segunda fase recuperam-se as células recolhidas a partir do sobrenadante numa centrifugação da solução de digestão após a primeira fase, e que têm a capacidade de aderir à superfície de um frasco de cultura celular, numa solução consistindo de sobrenadante e meio de cultura, num período de no mínimo 12h, numa incubadora de CO₂ e a 37°C; e finalmente, numa terceira fase, recuperam-se as células recolhidas a partir do sedimento da centrifugação da solução de digestão após a primeira fase, que são congeladas directamente, sem passar por qualquer fase de adesão e expansão/multiplicação.

A recuperação faseada, assim como todos os outros factores descritos anteriormente, foram optimizados por forma a tornar o método 100% eficaz e a maximizar os rendimentos, em termos de quantidade de células isoladas e seleccionadas, podendo estas ser identificadas pela população reunir as seguintes características: capacidade de adesão e multiplicação numa superfície e meio de cultura próprio para células mesenquimatosas, onde a maioria das células expressa os marcadores de superfície celular CD44, CD73, CD90 e CD105, e onde a maioria das células apresenta apenas expressão residual dos marcadores de superfície celular CD14, CD31, CD34 e CD45, e onde as células apresentam capacidade de expansão que pode atingir os 18 ciclos de expansão/multiplicação, mantendo uma taxa de

multiplicação de aproximadamente 1,7/24h e uma morfologia fibroblastóide constantes, e finalmente, onde as células mantêm a capacidade de se diferenciarem parcial ou terminalmente noutro tipo de células, como sejam, comprovadamente, os osteoblastos, e os condrócitos, e os adipócitos, e os cardiomiócitos, e as células gliais.

Adicionalmente, a presente invenção contempla também a optimização da densidade celular (células/vol) na criopreservação das células que passam por uma fase de adesão e expansão/multiplicação, com o propósito de maximizar a eficiência, sendo esta traduzida em número de células e sua viabilidade para uso futuro.

Com o método agora desenvolvido é possível obter, em 100% das amostras processadas, facto sem precedentes no estado da arte, e em nove dias, após congelação directo duma fracção das células, e após uma fase de adesão e expansão/multiplicação ex vivo (final de P0), da maioria das mesmas, rendimentos na ordem das $8,6(\pm 0,1) \times 10^5$ células/grama de cordão umbilical processado. Este rendimento representa a possibilidade de obter, a partir de um cordão umbilical (tendo em média 35cm), um total de $3,0 \times 10^9$ células. Por sua vez, as características das células permitem obter, por exemplo, em 35 dias, no final de P6, uma média de $7,7 \times 10^{15}$ células, utilizando um inóculo constante de $5,0 \times 10^5$ células/cm² ao longo das 6 passagens. No final, este rendimento representa uma redução de, no mínimo, 56% do tempo necessário para obter o mesmo número de células com os protocolos semelhantes existentes no estado da arte. De acordo com o descrito anteriormente, e para atingir números próximos das $1,0 \times 10^{15}$ células, utilizando o mesmo inóculo inicial, seriam necessários no

mínimo 80 dias (Harris et al., 2006; Can and Karahuseyinoglu, 2007).

O método visa a utilização das células isoladas para vários fins, sendo o primordial a terapia celular, mas podendo ser estendido à criação de bancos celulares, formas de terapia genética, composições farmacológicas, composições cosméticas, produção de moléculas ou compostos moleculares, produção de camadas de células de suporte para cultura ou para servir de base para gerar linhas celulares através da manipulação genética das células em questão.

Descrição dos desenhos

Figura 1: Conjuntos de células obtidos recorrendo à técnica de citometria de fluxo. As células foram imuno-identificadas utilizando anticorpos acoplados a um de dois fluoróforos, PE ou FITC, contra os antígenos CD44 (97% das células), CD73 (99% das células), CD90 (97% das células) e CD105 (95% das células), todos marcadores positivos do estroma mesenquimal.

Figura 2: Conjuntos de células obtidos recorrendo à técnica de citometria de fluxo. As células foram imuno-identificadas utilizando anticorpos acoplados a um de dois fluoróforos, PE ou FITC, contra antígenos que são reconhecidamente marcadores negativos para a linhagem mesenquimal: CD14, da linhagem monocítica (<1% das células), CD34 (1,2% das células), específico para a linhagem hematopoiética; CD31 (1% das células), marcador endotelial e de algumas subpopulações de células da

linhagem sanguínea, e CD45 (1,1% das células), marcador panleucocitário.

Figura 3: O efeito da densidade celular na eficiência da criopreservação das células, após uma fase de adesão e expansão/multiplicação, foi determinado por forma a otimizar o processo de preservação por congelação: A - viabilidade após descongelação (células viáveis/células totais x 100%, ambos após descongelação, em função da densidade de congelação). B - Recuperação celular (células viáveis recuperadas após descongelação/células viáveis inicialmente congeladas, em função da densidade de congelação). Os resultados indicam 3×10^6 células/mL como a densidade que oferece maiores garantias de manutenção e recuperação de células viáveis durante e após o congelação, nas condições escolhidas, (criotubos estéreis, de 1,5ml, contendo 1ml de suspensão celular).

Figura 4: A capacidade de expansão ex vivo em cultura das células descongeladas foi controlada e verificou-se que o factor de multiplicação de aproximadamente 1,7/24h, típico destas células antes da criopreservação, se manteve, atingindo-se uma confluência de 80-90%, 36h após o descongelação (mudança de meio às 24h): A - Células precursoras 12h após descongelação, antes das mudança de meio. B - Células precursoras 36h após descongelação (mudança de meio feita às 24h). Barras de escala = 100 μ m.

Figura 5: Diferenciação das células precursoras, isoladas através do método desenvolvido, em osteoblastos, adipócitos e condrócitos. A - Morfologia celular das células controlo (sem diferenciação) em meio de manutenção e multiplicação. B - Diferenciação osteogénica: as células foram inoculadas

em meio de diferenciação osteogénica, e mantidas durante 3 semanas, ao fim das quais foram realizados ensaios de coloração específica com Fosfatase alcalina. C - Diferenciação adipogénica: as células foram inoculadas em meio de manutenção e multiplicação até atingirem uma confluência de 100%. Quando tal aconteceu, o meio foi mudado para meio de diferenciação adipogénica, durante 3 semanas, ao fim das quais foram realizados os ensaios de coloração específica com Óleo-O-Vermelho. D - Diferenciação condrogénica: as células foram ressuspendidas e mantidas num tubo cónico, em meio de diferenciação condrogénica, durante 4 semanas, ao fim das quais se procedeu ao ensaio de coloração específica com Azul de Alcian e hematoxilina. Barras de escala = 100 μ m.

Figura 6: Diferenciação das células precursoras, isoladas através do método desenvolvido, em cardiomiócitos. A - Morfologia celular das células controlo (sem diferenciação) em meio de cultura basal Alpha-Mem, suplementado apenas com 10% FBS e 1% de Penicilina/Estreptomicina. B - Morfologia celular das células após diferenciação cardiomiogénica. C - Células controlo (sem diferenciação) detectadas através de imunofluorescência. Foi utilizado um anticorpo primário contra uma proteína típica dos tecidos musculares, a Troponina T cardíaca, específica dos cardiomiócitos. Para efeitos de localização das células em cultura, os núcleos celulares foram detectados com o fluorocromo DAPI. Na cultura das células controlo só é possível detectar os núcleos corados com DAPI. D - Células diferenciadas detectadas através de imunofluorescência. Foi utilizado um anticorpo primário contra uma proteína típica dos tecidos musculares, a Troponina T cardíaca, específica dos cardiomiócitos. Para efeitos de localização das células em

cultura, os núcleos celulares foram corados com o fluorocromo DAPI. Na cultura das células diferenciadas é possível detectar o citoesqueleto das células, corado para a Troponina T, assim como os núcleos, corados com DAPI.

Figura 7: Diferenciação das células precursoras, isoladas através do método desenvolvido, em células neuronais/gliais. A - Morfologia celular das células controlo (sem diferenciação) em meio de cultura basal Alpha-Mem, suplementado apenas com 10% FBS e 1% de Penicilina/Estreptomicina. B - Morfologia celular das células após diferenciação neuronal/glial. C - Células controlo (sem diferenciação) detectadas através de imunofluorescência. Foi utilizado um anticorpo primário contra a β - tubulina III, uma proteína típica das células neuronais/gliais. Para efeitos de localização das células em cultura, os núcleos celulares foram detectados com o fluorocromo DAPI. Na cultura das células controlo só é possível detectar os núcleos corados com DAPI. D - Células diferenciadas detectadas através de imunofluorescência. Foi utilizado um anticorpo primário contra a β - tubulina III, uma proteína típica das células neuronais/gliais. Para efeitos de localização das células em cultura, os núcleos celulares foram corados com o fluorocromo DAPI. Na cultura das células diferenciadas é possível detectar o citoesqueleto das células, corado para a β - tubulina III, assim como os núcleos, corados com DAPI.

Descrição pormenorizada da invenção

1. Aspectos prévios: previamente à aplicação do método, o cordão umbilical, desprovido de placenta, é escorrido de

sangue e colocado num contentor apropriado, estéril, devidamente fechado, numa solução de transporte, preferencialmente um tampão salino ou meio fisiológico similar, como seja uma solução salina de *Hanks* (HBSS), suplementado com nutrientes e antibióticos, como seja 1g/L de glucose, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina, podendo ser utilizado qualquer outro antibiótico similar. Nesta fase podem adicionar-se também compostos fungicidas.

O transporte até ao laboratório deve ser feito preferencialmente à temperatura ambiente, desde que a amostra seja processada num período até 48h. Para períodos de espera superiores, aconselha-se uma temperatura de transporte e armazenamento entre os 2 e os 8°C.

O método deve ser efectuado em ambiente estéril, como seja em câmara de fluxo laminar vertical.

2. Teor da invenção: método optimizado e definido de isolamento de células precursoras a partir do cordão umbilical humano

O cordão é lavado 3 vezes com solução tampão salina de *Hanks* (HBSS) e a película exterior (membrana amniótica) retirada com o auxílio de uma pinça estéril.

O cordão é então sujeito a um fraccionamento transversal, com o auxílio dum bisturi, consistindo de cortes num plano perpendicular ao eixo do cordão umbilical, produzindo fracções de 2,5cm. Tendo em consideração que, em média, a densidade do cordão umbilical é aproximadamente 1g/cm, cada fracção corresponde a aproximadamente 2,5g de tecido.

Caso alguma fracção de cordão umbilical contenha coágulos de sangue inseridos, estes são eliminados, com o auxílio dum bisturi, nos locais onde os coágulos foram identificados.

Para os passos seguintes, as fracções de 2,5g, agora todas isentas de coágulos, são agrupadas em grupos de 7 e cada grupo é tratado de forma independente.

As células totais são então dissociadas, a partir de cada grupo de 7 fracções de tecido do cordão umbilical, recorrendo a uma digestão enzimática, efectuada num recipiente estéril, selado com tampa estanque, através da acção conjunta da collagenase II a uma concentração de 0,075% (peso/volume solução de digestão), com a tripsina a uma concentração de 0,125% (peso/volume solução de digestão), mantendo uma relação proporcional definida, entre a massa de tecido (g), a superfície do fundo do recipiente onde assenta o tecido durante a digestão (cm²), o volume de solução digestão (ml), e o volume total do recipiente (cm³), de aproximadamente, 1:2:2:37; tendo em consideração que, em média, uma fracção de 1cm de cordão umbilical humano pesa 1g. Mais especificamente, parte-se de 7 fracções de cordão umbilical com 2,5g cada (um total 17,5g de tecido), utilizando um volume de solução de digestão de 35ml, num *Frasco de cultura de tecidos*, com um volume total interior de 650cm³ (T₁₇₅ da NUNC). O volume de ar remanescente após a adição da solução de digestão corresponde a 615cm³, menos o volume ocupado pelas 7 fracções de tecido. Por sua vez, a solução de digestão consiste, para além das enzimas, duma solução salina tampão do tipo *Hanks*, suplementada com Ácido etileno-diamino-

tetra-acético (EDTA); mais especificamente, 186µg/ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 400 µg/ml KCl, 60 µg/ml KH_2PO_4 , 200 µg/ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8000µg/ml NaCl, 350 µg/ml NaHCO_3 , 90 µg/ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1000 µg/ml glucose, e 76 µg/ml (0,260mM) EDTA.

A reacção enzimática é então incubada por um período de tempo correspondente a 4h, com uma agitação de 100 oscilações.min⁻¹ (opm), sendo estas oscilações promovidas por uma placa oscilatória, num plano paralelo ao plano da plataforma da mesma placa, mantendo o frasco de cultura de células fixado à plataforma da placa oscilatória na posição vertical (tampa para cima), dentro duma câmara de ar seco climatizada, e a uma temperatura constante do ar, dentro da câmara, de 37°C.

A recuperação das células dissociadas do tecido processa-se duma forma faseada, sendo que numa primeira fase, que ocorre logo após o período de incubação da reacção de digestão, se recuperam as células que têm a capacidade de aderir à superfície de crescimento de cultura celular, dentro do frasco onde é processada a digestão, ainda na presença da solução de digestão, com o frasco mantido na sua posição horizontal, durante um período que pode variar entre 5 a 300 minutos, preferencialmente 30 minutos, à temperatura e meio ambiente.

Após 30 minutos, a solução de digestão é colocada num tubo de centrifuga de 50mL e é centrifugada a 350g, durante 10min, à temperatura ambiente.

Entretanto, decantam-se do frasco onde foi processada a digestão quaisquer resquícios de tecido não digerido e adicionam-se ao mesmo 35ml de meio de cultura *Alpha MEM* com

desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos e glutamina, suplementado com 10% de Soro fetal bovino (FBS), 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina, por forma a iniciar uma fase de expansão/multiplicação das células que foram capazes de aderir ao suporte de cultura durante os cerca de 30 minutos de selecção. A cultura celular é incubada a 37°C numa incubadora com uma atmosfera húmida, contendo 7% CO₂. As células resultantes desta cultura serão o produto da primeira fase de aproveitamento/selecção, cujo processo ocorre com mudanças da totalidade do meio em intervalos de 72h, até a cultura atingir a confluência máxima. Este período pode variar entre 4 a 12 dias. O frasco de cultura está agora apetrechado com uma tampa com filtro, permitindo assim trocas gasosas.

Na segunda fase de aproveitamento/selecção recuperam-se as células a partir do sobrenadante resultante duma centrifugação da solução de digestão, recolhida por pipetagem a partir do recipiente de digestão para um tubo de centrifuga do tipo *Falcon* de 50ml, evitando a sucção de porções de tecido remanescentes. Tal como na primeira fase, as células seleccionadas a partir do sobrenadante têm a capacidade de aderir à superfície de um frasco de cultura celular T₁₇₅ (NUNC), e entrar numa fase de expansão/multiplicação, desta feita numa solução consistindo de 35ml de sobrenadante e 35ml de meio *Alpha MEM* com desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos e glutamina, suplementado com 10% de Soro fetal bovino (FBS), 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina, numa incubadora a 37°C, com uma atmosfera húmida, contendo 7% CO₂. O processo de selecção ocorre também com mudanças da totalidade do meio em intervalos de 72h, até a cultura atingir a confluência máxima. Tal como anteriormente, este

período pode variar entre 7 a 12 dias. O frasco desta cultura está também apetrechado com uma tampa com filtro, permitindo assim trocas gasosas.

As populações de células obtidas no final da primeira e da segunda fase de aproveitamento/selecção, que se encontram no final de um primeiro ciclo de expansão/multiplicação (final de P0), são criopreservadas a uma densidade de 3×10^6 células/mL. Para o efeito, 1ml duma mistura vol/vol de suspensão celular em meio de cultura, contendo o número de células desejado, e uma solução de 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 90% Soro fetal bovino (FBS), é congelado directamente na fase de vapor do azoto líquido, num criotubo estéril de 1.5mL (TPP contendo 1ml de suspensão celular e aproximadamente $0,5\text{cm}^3$ de volume de ar remanescente).

No que diz respeito à terceira e ultima fase de aproveitamento/selecção, esta baseia-se na congelação directa, sem que as células passem por qualquer fase de adesão e expansão/multiplicação, do sedimento celular, contendo entre 1 e 2×10^6 células, resultante da centrifugação da solução de digestão, utilizando um congelador com controlo de taxa de refrigeração, com um taxa de decréscimo de temperatura de $1^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$, até uma temperatura final de -80°C , em 2ml duma solução de Soro fetal bovino (FBS), com 10% Dimetilsulfóxido (DMSO), num criotubo estéril de 2,5mL, contendo 2ml de suspensão celular e aproximadamente $0,5\text{cm}^3$ de volume de ar remanescente.

As células criopreservadas são recuperadas quando necessário através de um descongelação rápido, num banho a

37°C, ressuspendidas em meio de cultura previamente aquecido à mesma temperatura, por forma a que, no total, a suspensão celular seja diluída no mínimo 1:10.

as novas fases de adesão e expansão/multiplicação iniciam-se com uma densidade de inóculo que pode variar entre 5.0×10^3 células/cm² e as 2.0×10^4 células/cm², com mudanças da totalidade do meio em intervalos de 72h, caso necessário. As células apresentam tipicamente uma taxa de multiplicação constante de 1,7/24h.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: Optimização do tipo de manipulação mecânica e dimensão das porções de tecido inicial a utilizar.

O tipo de manipulação mecânica e dimensão das porções de tecido inicial a utilizar foram optimizados, mantendo constante uma relação proporcional definida entre a massa de tecido (g), a superfície do fundo do recipiente onde assenta o tecido durante a digestão (cm²), o volume de solução digestão (ml), e o volume total do recipiente (cm³) de, aproximadamente, 1:2:2:37; tendo em consideração que, em média, uma fracção de 1cm de cordão umbilical humano pesa 1g. Assim, após retirada a membrana amniótica, foram comparados diversos tipos de fraccionamento transversal, consistindo de cortes num plano perpendicular ao eixo do cordão umbilical, produzindo um fraccionamento baixo/nulo (porções de 5cm - máximo comprimento processado), um fraccionamento médio (porções de 2,5cm - máximo comprimento dividido em dois), um fraccionamento elevado (porções de 0,3cm), e um fraccionamento milimétrico, reduzindo a

fracção de 5cm inicial a porções milimétricas. Todos os fraccionamentos foram executados com o auxílio dum bisturi e as amostras processadas de igual forma daí por diante. Concluiu-se que a utilização de fracções com 2,5cm de comprimento resulta, na maioria dos ensaios, em melhores rendimentos em termos de número de células no final de P0/massa de cordão umbilical/tempo despendido. A Tabela 1 resume qualitativamente os resultados obtidos.

Tabela 1: fraccionamento

Baixo/nulo (5cm)	Médio (2,5cm)	Elevado (0,3cm)	Milimétrico
+	++	+	-

Chave: +++ = Excelente, ++ = muito bom, + = bom, - = sofrível, -- = mau, 0 = sem sucesso

EXEMPLO 2: Optimização relativa à presença ou ausência de coágulos de sangue dentro dos vasos umbilicais (1 veia e 2 artérias).

É sabido que a hemoglobina pode ser tóxica e como tal diminuir a viabilidade celular das células *in vitro*. Como tal, avaliaram-se os rendimentos obtidos através dum método onde os coágulos de sangue foram eliminados com um bisturi. Este procedimento foi comparado com outro onde os coágulos permaneceram dentro dos vasos umbilicais, influenciando assim a viabilidade celular, e quando aplicado, a actividade enzimática nos passos subsequentes do método de isolamento. Conclui-se que os coágulos representavam uma taxa negativo, prejudicando claramente os rendimentos em termos de número de células viáveis obtidas no final de P0/massa de cordão umbilical/tempo despendido. A Tabela 2 resume qualitativamente os resultados obtidos.

Tabela 2: coágulos

Presença

Ausência

-

++

Chave: +++ = Excelente, ++ = muito bom, + = bom, - = sofrível, -- = mau, 0 = sem sucesso

EXEMPLO 3: Optimização relativa à natureza, acção individual ou combinada, e concentração/ões da/s enzima/as a utilizar no passo de digestão do tecido.

Por forma a maximizar os rendimentos em termos de número de células isoladas, com as características desejadas, relativamente à forma de promover a dissociação das mesmas a partir do tecido inicial, testou-se a adesão celular directa à superfície do frasco de cultura, na presença de meio de cultura, sem libertação assistida por uma digestão enzimática, em comparação com a libertação de células a partir da matriz do cordão umbilical assistida com uma única enzima: 0,0750% (p/v) de collagenase II ou 2,0% (p/v) de pronase. Dada a maior eficiência da collagenase II, testou-se então a acção conjunta da mesma com 0,125% (p/v) de tripsina (na presença e ausência de 0,260mM Ácido etileno-diamino-tetra-acético - EDTA); a acção conjunta de 0,0750% (p/v) de collagenase II com 0,5% (p/v) de hialuronidase; e finalmente, a acção conjunta de 0,0750% (p/v) de collagenase II, 2,0% (p/v) de pronase e 0,5% (p/v) de hialuronidase. Para o efeito, utilizaram-se fracções isoladas de cordão umbilical com 2,5cm, mas mantendo-se sempre a relação proporcional entre a massa de tecido (g), a superfície do fundo do recipiente onde assenta o tecido durante a digestão (cm²), o volume de solução digestão (ml), e o volume total do recipiente (cm³) de 1:2:2:37. Concluiu-se que a liberação assistida de células através da acção conjunta de 0,0750% (p/v) de collagenase II com 0,125% (p/v) de tripsina produz melhores rendimentos em termos de

número de células obtidas por massa de tecido e unidade de tempo. Adicionalmente, variando a concentração da collagenase II (0,0375%, 0,0750%, 0,150% - p/v), concluiu-se ainda que a acção conjunta resulta melhor utilizando a collagenase II a uma concentração de 0,075% (p/v), mantendo a tripsina a uma concentração de 0,125% (p/v), na presença de 0,260mM EDTA. A Tabela 3 resume qualitativamente os resultados obtidos.

Tabela 3: natureza, acção combinada e concentração enzimática.

	s/enzima	Pronase (2,0%)	Col II (0,0375%)	Col II (0,075%)	Col II (0,150%)
s/enzima	0	--	-	+	--
Tripsina (0,125%)	X	X	+	+	--
Tripsina (0,125%) + EDTA (0,260mM)	X	X	X	++	X
Hialuronidase (0,5%)	X	X	X	+	X
Pronase (2,0%) e Hialuronidase (0,5%)	X	X	X	+	X

Chave: +++ = Excelente, ++ = muito bom, + = bom, - = sofrível, -- = mau,
0 = sem sucesso, X = não testado

EXEMPLO 4: Optimização relativa à composição da solução onde é processada a reacção de digestão enzimática.

Testaram-se várias composições da solução de digestão, nomeadamente Alpha-Mem, suplementado com 20% Soro fetal bovino (FBS), e 1% de penicilina/estreptomicina; solução tampão salina do tipo *Hanks* (HBSS), suplementada com Ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA); mais especificamente, 186µg/ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 400 µg/ml KCl, 60 µg/ml KH_2PO_4 , 200 µg/ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8000µg/ml NaCl, 350 µg/ml NaHCO_3 , 90 µg/ml

NaH₂PO₄·7H₂O, 1000 µg/ml glucose, e 76 µg/ml (0,260mM) EDTA; a mesma solução tampão salina do tipo Hanks (HBSS), mas desta feita suplementada com 5mM CaCl₂; E solução de Ácido-4-(2-Hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES) 25mM suplementada com 5mM CaCl₂. Para o efeito, mantiveram-se todas as condições que melhores resultados deram em optimizações anteriores, utilizando collagenase II a uma concentração de 0,075% (p/v), com tripsina a uma concentração de 0,125% (p/v) como composição enzimática. Confirmou-se que a solução tampão salina do tipo Hanks (HBSS), suplementada com 0,260mM EDTA produziu os melhores rendimentos. A Tabela 4 resume qualitativamente os resultados obtidos.

Tabela 4: composição da solução de digestão enzimática.

	Alpha-Mem + 20% FBS + 1% pen/estrep	HBSS + 0,26mM EDTA	HBSS + 5mM CaCl ₂	25mM HEPES + 5mM CaCl ₂
Col II (0,075%) + Tripsina (0,125%)	--	++	-	+

Chave: +++ = Excelente, ++ = muito bom, + = bom, - = sofrível, -- = mau,
0 = sem sucesso.

Exemplo 5- Optimização relativa ao período/tempo de incubação da reacção enzimática de digestão.

Testaram-se vários períodos de incubação (2h, 4h, 6h e 16h). Conclui-se que 4h de incubação produziu os melhores rendimentos, apesar das digestões mais completas terem ocorrido às 16h de incubação. A acidificação do meio, com prejuízo na viabilidade celular pode ser uma justificação para este facto. A Tabela 5 resume qualitativamente os resultados obtidos.

Tabela 5: tempo de incubação e pH da solução da reacção enzimática

	2h	4h	6h	16h
Col II (0,075%) + Tripsina (0,125%) em HBSS + 0,26mM EDTA	+	++	-	+
	(pH 6,9)	(pH 6,4)	(pH 6,1)	(pH 5,9)

Chave: +++ = Excelente, ++ = muito bom, + = bom, - = sofrível, -- = mau, 0 = sem sucesso

Exemplo 6: Optimização relativa à forma de agitação (suave ou vigorosa), durante o período de incubação, da reacção enzimática de digestão.

A incubação foi feita num banho orbital com uma agitação suave ou vigorosa, consistindo de 100 e 140 oscilações por minuto (opm), respectivamente. A agitação suave, de 100 opm, produziu melhores rendimentos. A Tabela 6 resume qualitativamente os resultados obtidos.

Tabela 6: agitação

100 opm	140 opm
++	+

Chave: +++ = Excelente, ++ = muito bom, + = bom, - = sofrível, -- = mau, 0 = sem sucesso

Exemplo 7: Optimização relativa ao ambiente de incubação da reacção enzimática de digestão (seco ou húmido).

A incubação foi feita a 37°C, em dois ambientes diferentes. Para o efeito foi utilizado um agitador orbital de imersão, onde a dispersão/distribuição de calor foi feita através de água e ar húmido (derivada da evaporação e condensação), em

comparação com uma câmara seca climatizada, onde a dispersão/distribuição de calor foi feita através do ar. A incubação dentro da câmara seca climatizada resultou em melhores rendimentos. A Tabela 7 resume qualitativamente os resultados obtidos.

Tabela 7: ambiente de incubação

Banho húmido	Câmara seca
++	+++

Chave: +++ = Excelente, ++ = muito bom, + = bom, - = sofrível, -- = mau, 0 = sem sucesso

Exemplo 8: optimização relativa ao efeito da densidade celular na eficiência da criopreservação de células sujeitas a adesão e expansão/multiplicação

As células foram congeladas no final de P1 na fase de vapor do azoto líquido, fazendo variar a densidade entre 1×10^6 e 10×10^6 células/mL. Foram usados tubos de 1.5mL (criotubos estéreis), contendo 0,5ml de suspensão celular e o mesmo volume duma solução 10% Dimetilsulfóxido e 90% soro bovino fetal (FBS)

As células foram criopreservadas desta forma durante um mês (31 dias), altura em que foram descongeladas rapidamente num banho a 37°C, ressuspendidas em 10ml de meio de cultura previamente aquecido a 37°C, contadas as células totais e viáveis e inoculadas em frascos de cultura de tecidos (NUNC), por forma a que, no total, a suspensão celular fosse diluída no mínimo 1:10.

Após 24h, foi retirada a totalidade do meio e este foi substituído por meio de cultura fresco. As células foram então mantidas como acima descrito.

De forma a determinar a densidade de congelação óptima, as viabilidades após descongelação (% células viáveis/células totais congeladas em função da densidade de congelação) e a recuperação celular (% células viáveis recuperadas após descongelação / células viáveis inicialmente congeladas em função da densidade de congelação) foram determinadas. Os resultados indicam que 3×10^6 células/mL é a densidade que oferece maiores garantias de manutenção e recuperação de células viáveis durante e após o congelação, nas condições utilizadas (criotubos estéreis, 1.5ml, contendo 1ml de suspensão celular e $0,5\text{cm}^3$ de ar remanescente).

A capacidade de multiplicação *ex vivo*, em cultura, das células descongeladas foi controlada e verificou-se que o factor de multiplicação de 1,7/24h, típico destas células antes da criopreservação, se manteve inalterado (Fig.4).

EXEMPLO 9: Isolamento de células precursoras a partir de cordões umbilicais humanos, através do método desenvolvido.

Após consentimento informado por parte das mães e obtida a autorização por parte das Comissões de Ética das instituições onde foram efectuados os partos, os cordões umbilicais foram recolhidos pós-parto (natural ou cesariana), separados das respectivas placentas, escorridos de sangue e colocados em tampão salino de transporte (solução salina de Hanks: HBSS, Sigma Aldrich), suplementado com 1g/L de glucose, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina.

O transporte dos cordões até ao laboratório foi efectuado à temperatura ambiente em recipientes de polipropileno

estéreis e hermeticamente fechados. A partir daí, o processamento de cada cordão umbilical, assim como o isolamento das células precursoras, foram efectuados de forma independente, em câmara de fluxo laminar vertical, sob condições de esterilidade, 24h após a recolha.

Cada cordão foi lavado 3 vezes com HBSS e a membrana exterior (membrana amniótica) retirada com o auxílio de uma pinça estéril.

Cada cordão foi então sujeito a um fraccionamento transversal, com o auxílio dum bisturi, consistindo de cortes num plano perpendicular ao eixo do mesmo, produzindo fracções de 2,5cm. Tendo em consideração que, em média, a densidade do cordão umbilical é aproximadamente 1g/cm, cada fracção correspondeu a aproximadamente 2,5g de tecido.

Os coágulos de sangue presentes em algumas fracções foram eliminados com o auxílio dum bisturi, nos locais onde foram identificados.

As fracções de 2,5g, agora isentas de coágulos, foram então agrupadas em grupos de 7 e cada grupo foi tratado de forma independente.

As células foram dissociadas a partir de cada grupo de 7 fracções de tecido do cordão umbilical recorrendo à acção conjunta da colagenase II, a uma concentração de 0,075% (peso/volume solução de digestão), com tripsina, a uma concentração de 0,125% (peso/volume solução de digestão), utilizando um volume de solução de digestão de 35ml, num *Frasco de cultura de tecidos*, com um volume total interior de 650cm³ (T₁₇₅ da NUNC). O volume de ar remanescente após a

adição da solução de digestão corresponde a 615cm^3 , menos o volume ocupado pelas 7 fracções de tecido, numa solução de digestão consistindo, para além das enzimas, de $186\mu\text{g/ml}$ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $400\mu\text{g/ml}$ KCl , $60\mu\text{g/ml}$ KH_2PO_4 , $200\mu\text{g/ml}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $8000\mu\text{g/ml}$ NaCl , $350\mu\text{g/ml}$ NaHCO_3 , $90\mu\text{g/ml}$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1000\mu\text{g/ml}$ glucose, e $76\mu\text{g/ml}$ ($0,260\text{mM}$) EDTA. A reacção enzimática foi incubada 4h, com uma agitação de $100\text{ oscilações.min}^{-1}$ (opm), sendo estas oscilações promovidas por uma placa oscilatória, num plano paralelo ao plano da plataforma da placa, mantendo o frasco de cultura de células fixado à plataforma da mesma na posição vertical (tampa para cima), dentro duma câmara de ar seco climatizada, e a uma temperatura constante do ar de 37°C .

A recuperação das células dissociadas do tecido processou-se duma forma faseada, sendo que numa primeira fase, logo após o período de incubação da reacção de digestão, se recuperaram as células com capacidade de aderir à superfície de crescimento de cultura celular, dentro do frasco onde foi processada a digestão, e ainda na presença da solução de digestão. Para o efeito, o frasco foi mantido na sua posição horizontal, durante um período de 30 minutos, à temperatura e meio ambiente. Após esse período, a solução de digestão foi centrifugada a $350g$, durante 10min, à temperatura ambiente, num tubo de centrifuga de 50mL (*Falcon*).

Simultaneamente, decantaram-se os resquícios de tecido não digerido do frasco onde foi processada a digestão e adicionaram-se ao mesmo 35ml de meio de cultura *Alpha MEM* com desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos e glutamina, suplementado com 10% de Soro fetal bovino (FBS), 100U/mL de penicilina e $100\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (antibióticos da

Cambrex), iniciando-se assim uma fase de expansão/multiplicação das células que foram capazes de aderir ao suporte de cultura durante 30 minutos de selecção. Esta cultura celular foi incubada com o frasco de cultura apetrechado com uma tampa com filtro, permitindo assim trocas gasosas, a 37°C numa incubadora com uma atmosfera húmida, contendo 7% CO₂, com uma mudança da totalidade do meio em intervalos de 72h, durante 7 dias, tempo que a cultura levou a atingir a confluência máxima.

Na segunda fase de aproveitamento/selecção recuperaram-se as células a partir do sobrenadante resultante da centrifugação da solução de digestão, recolhida por pipetagem a partir do recipiente de digestão para um tubo de centrifuga de 50ml (*Falcon*), evitando a sucção de porções de tecido remanescentes. Tal como na primeira fase, as células foram seleccionadas através da sua capacidade de aderir e entrar numa fase de expansão/multiplicação, na superfície de um frasco de cultura celular T₁₇₅ (NUNC), apetrechado com uma tampa com filtro, permitindo trocas gasosas, desta feita numa solução consistindo de 35ml de sobrenadante e 35ml de meio de *Alpha MEM* com desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos e glutamina, suplementado com 10% de Soro fetal bovino (FBS), 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina, numa incubadora a 37°C, com uma atmosfera húmida, contendo 7% CO₂. O processo de selecção ocorreu também com mudanças da totalidade do meio em intervalos de 72h, durante 7 dias, altura em que a cultura atingiu a confluência máxima.

As populações de células obtidas no final da primeira e da segunda fases de aproveitamento/selecção, foram criopreservadas a uma densidade de 3x10⁶ células/mL. Para o

efeito, as respectivas suspensões celulares, contendo o número de células desejado, foram feitas em 500 μ l de meio de cultura *Alpha MEM* com desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos e glutamina, suplementado com 10% de Soro fetal bovino (FBS), 100U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina, e misturadas com o mesmo volume (500 μ l) numa solução de 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 90% Soro fetal bovino (FBS). A mistura foi congelada directamente na fase de vapor do azoto líquido, num criotubo estéril de 1.5mL (contendo aproximadamente 1ml de suspensão celular e aproximadamente 0,5cm³ de volume de ar remanescente).

Na terceira e última fase de aproveitamento/selecção, os sedimentos celulares, resultantes da centrifugação da solução de digestão, contendo entre 1 e 2x10⁶ células, foram criopreservados directamente utilizando um congelador com controlo de taxa de refrigeração (*Planer*), com uma taxa de decréscimo de temperatura de 1°C.min⁻¹, até uma temperatura final de -80°C, em 2ml numa solução de Soro fetal bovino (FBS), com 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO), num criotubo estéril de 2,5mL, contendo 2ml de suspensão celular e aproximadamente 0,5cm³ de volume de ar remanescente.

As células criopreservadas foram todas recuperadas 31 dias após a criopreservação das populações resultantes das duas primeiras fases de aproveitamento/selecção através numa descongelação rápida, num banho a 37°C, ressuspendidas em meio de cultura previamente aquecido à mesma temperatura, por forma a que, no total, a suspensão celular fosse diluída no mínimo 1:10.

Iniciaram-se fases de adesão e expansão/multiplicação, em frascos de cultura de tecidos com superfícies de 175cm^2 (T_{175} da NUNC), com uma densidade de inóculo de 5.0×10^3 células/ cm^2 em todas as passagens (P), com mudanças da totalidade do meio em intervalos de 72h. As células apresentaram uma taxa de multiplicação constante de $1,7/24\text{h}$ durante 18 passagens (P).

EXEMPLO 10: Certificação do carácter mesenquimatoso das células precursoras isoladas.

Para além da capacidade de adesão e multiplicação num meio de cultura selectivo para células precursoras, mesenquimatosas, as células isoladas foram caracterizadas, no final de P1, recorrendo à técnica de citometria de fluxo.

Quando as células atingiram uma confluência entre 80% e 90%, no final de P1, o meio de cultura foi aspirado e a cultura lavada com tampão fosfato *Dulbecco* (sem Ca^{2+} ou Mg^{2+}). Adicionou-se, então, tripsina-EDTA 0,25% e, assim que as células se libertaram da superfície, adicionaram-se 2 volumes de meio de cultura. Centrifugou-se a suspensão celular 10min a 350g, descartou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em solução bloqueante (0.2% BSA em dPBS), por forma a que a concentração final estivesse entre 2×10^6 e 10×10^6 células/ml.

Após um período de incubação de 10min à temperatura ambiente, adicionaram-se $100\mu\text{l}$ da suspensão celular a cada tubo já contendo os anticorpos primários conjugados com um de dois fluoróforos: ficoeritrina (PE) ou fluoresceína isotiocianato (FITC). A suspensão celular agitou-se bem e

incubou-se em gelo, protegida da luz, durante 20-40min. Ao fim deste período, adicionaram-se a cada tubo 1.5ml dPBS, ressuspendeu-se bem a suspensão celular e centrifugou-se a 350g durante 5min. Descartou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 500µl de paraformaldeído 1%.

A suspensão foi armazenada a 4°C para posterior utilização. A citometria de fluxo efectuou-se num FACScalibur da BD Biosciences detectando-se os antigénios CD44, CD73, CD90 e CD105 como marcadores positivos do estroma mesenquimal. Para o efeito utilizaram-se anticorpos primários conjugados com FITC ou PE (Fig. 1). Como marcadores negativos, detectaram-se os antigénios CD14, CD31, CD34 e CD45, específicos para as linhagens hematopoiética (CD34), monocítica (CD14), endotelial (CD31), assim como o marcador panleucocitário (CD45); todos eles utilizando anticorpos conjugados com FITC (Fig. 2). Tal como desejado, a grande maioria das células mesenquimatosas isoladas apresentaram-se positivas para CD44, CD73, CD90 e CD105 e apenas uma quantidade residual deu sinal para os marcadores negativos.

EXEMPLO 11: Demonstração do carácter precursor das células isoladas: diferenciação osteogénica

De acordo com a descrição pormenorizada da invenção, as células precursoras, isoladas a partir de fracções de cordão umbilical humano, demonstraram ter a capacidade de se diferenciarem em diferentes tipos de células especializadas. Neste exemplo demonstra-se a capacidade de diferenciação em células constituintes do tecido ósseo: osteoblastos.

As células foram inoculadas a P3, à densidade de 2.0×10^4 células/cm², em meio de diferenciação osteogénica, constituído por α -MEM com 10% FBS, 10mM β -glicerofosfato, 100U/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomicina, 50 μ g/ml ascorbato-2-fosfato, 100nM dexametasona (Hung et al., 2002).

O meio foi mudado na totalidade 2 vezes por semana, durante 3 semanas ao fim das quais foram realizados ensaios de coloração específica com Vermelho de Alizarina e Fosfatase Alcalina, ambos positivos. No caso da coloração com Vermelho de Alizarina, o meio foi cuidadosamente aspirado do frasco de cultura de tecidos e as células fixadas com paraformaldeído 4%, durante 10 minutos à temperatura ambiente.

As células foram então lavadas com PBS e incubadas com uma solução corante específica, Vermelho de Alizarina S, 40mM, pH 4.2, durante 15min, à temperatura ambiente. A solução de Vermelho de Alizarina S foi então removida e as células lavadas cuidadosamente com água (Kotobuki, et al., 2006).

No caso do teste da Fosfatase Alcalina (Sigma-Aldrich), as células também foram fixadas com paraformaldeído 4%, durante 10min, à temperatura ambiente. Posteriormente, lavaram-se as células com PBS e cobriram-se com 2.5ml de uma solução de citrato, incubando-se durante 30 segundos.

A solução de citrato foi então removida e as células lavadas com água desionizada (milliQ) e incubadas com uma solução corante específica, vermelho neutro, durante 2min. A solução de vermelho neutro foi removida e as células lavadas cuidadosamente com água (Shim, et al., 2004). O

teste acusou positivo para a diferenciação osteogénica (Fig.5).

EXEMPLO 12: Demonstração do carácter precursor das células isoladas: diferenciação adipogénica

Com vista à diferenciação das células em adipócitos, as células foram inoculadas a P3, à densidade de 2.0×10^4 células/cm², em meio de cultura Alpha MEM com desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos e ultraglutamina, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina, e mantidas neste meio até atingirem uma confluência de 100%. Quando tal aconteceu, o meio foi mudado para meio de diferenciação adipogénica, consistindo de DMEM-LG com 10% FBS, 100U/ml penicilina, 100µg/ml estreptomicina, 10µg/ml insulina, 200µM indometacina, 0.5mM isobutilmetilxantina, 1µM dexametasona (Shih et al., 2005).

O meio foi mudado na totalidade 2 vezes por semana, durante 3 semanas, ao fim das quais foram realizados os ensaios de coloração específica com Óleo-O-Vermelho, confirmando-se assim a diferenciação adipogénica. Para este efeito o meio foi cuidadosamente aspirado do frasco de cultura de tecidos (NUNC) e as células fixadas com paraformaldeído 4%, durante 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram, então, lavadas com PBS e incubadas com uma solução de Óleo-O-Vermelho (2:3) filtrada, durante pelo menos 10 minutos à temperatura ambiente. A solução de Óleo-O-Vermelho foi então removida e as células lavadas cuidadosamente duas vezes com água (Do, et al., 2006). O teste acusou positivo para a diferenciação adipogénica (Fig.5).

EXEMPLO 13: Demonstração do carácter precursor das células isoladas: diferenciação condrogénica

Para a diferenciação em condrócitos as células foram ressuspensas a P3, à densidade de 1.0×10^6 células/ml e colocadas num tubo cónico de 15ml, com vista à formação de condrosferas. O meio de cultura utilizado foi meio de diferenciação condrogénica, consistindo de DMEM-LG com 1% soro bovino fetal (FBS), $6.25 \mu\text{g/ml}$ insulina, 10ng/ml TGF β 1, $50 \mu\text{M}$ ascorbato-2-fosfato (Shih et al., 2005).

O meio foi mudado na totalidade 2 vezes por semana, durante 4 semanas, tendo o cuidado de não perturbar as condrosferas, ao fim das quais se procederam aos ensaios com um corante específico, Azul de Alcian, e hematoxicilina, confirmando-se assim a diferenciação condrogénica. Para este efeito, o meio foi aspirado do tubo e as condrosferas lavadas com PBS. As condrosferas foram imersas em agar e congeladas na fase de vapor do azoto líquido.

Com o auxílio de um micrótomo, seccionou-se o agar gerando secções de tecido com $5 \mu\text{m}$ de espessura. Estas secções foram então coradas com uma solução 1% do corante específico Azul de Alcian, incubadas 5min à temperatura ambiente e lavadas com PBS. As preparações fixadas em lâminas de vidro foram passadas por uma solução de hematoxilina e incubadas 5min à temperatura ambiente. A hematoxilina foi então removida através de uma última lavagem com PBS (Okada, et al., 2005). O teste acusou positivo para a diferenciação condrogénica (Fig.5).

EXEMPLO 14: Demonstração do carácter precursor das células isoladas: diferenciação cardiomiogénica

A diferenciação cardiomiogénica decorreu durante um período de 18 dias, ao longo dos quais se utilizaram diferentes meios de cultura (Lee et al., 2004). As células foram inoculadas a uma densidade de 3000 células/cm² em placas de imuno-deteção de 16 poços, com revestimento de ornitina, usando um meio de cultura (Meio 0), constituído pelo meio basal Alpha-Mem, suplementado 10% FBS e 1% de Penicilina/Estreptomicina.

24 horas após a inoculação trocou-se o meio de cultura por um outro meio (Meio 1), constituído por meio basal DMEM-LG, suplementado com 10% FBS, 1% Penicilina/Estreptomicina, 2mM L-glutamina, 10 ng/mL de bFGF e 10 µM de 5-azacitidina.

24 horas após inoculação no Meio 1, procedeu-se a uma segunda troca de meio, para um meio (Meio 2) constituído por meio basal, suplementado com 10% FBS, 1% Penicilina/Estreptomicina, 2mM L-glutamina, e 10 ng/mL de bFGF.

As células foram mantidas em Meio 2 durante duas semanas, com mudança do mesmo em intervalos de 72h.

Em paralelo, foram inoculadas células controlo (sem diferenciação) à densidade 5000 células/cm², que foram mantidas em Meio 0. Decorrido o período de diferenciação, procedeu-se a um ensaio de imunofluorescência utilizando um anticorpo primário contra uma proteína típica dos tecidos musculares, a Troponina T cardíaca, específica dos cardiomiócitos. Para efeitos de localização das células em

cultura os núcleos celulares foram detectados com o fluorocromo DAPI, específico para os ácidos nucleicos. Tal como esperado, apenas as células que foram sujeitas ao protocolo de diferenciação cardiomiogénica, e que apresentavam à partida uma morfologia típica dos cardiomiócitos (Fig. 6B), produziram sinal de fluorescência na reacção com o anticorpo primário contra a Troponina T (Fig. 6D).

EXEMPLO 15: Demonstração do carácter precursor das células isoladas: diferenciação neurogénica/glial

A diferenciação neurogénica decorreu durante um período de 12 dias, ao longo dos quais se utilizaram diferentes meios de cultura (Lee et al., 2004).

As células foram inoculadas a uma densidade de 3000 células/cm² em placas de imuno-deteccção de 16 poços, com revestimento de ornitina, usando um meio de cultura (Meio 1), constituído pelo meio basal IMDM suplementado com 10% FBS, 1% Penicilina/Estreptomicina, 2mM L-glutamina (Sigma), 5 ng/mL de bFGF; 0,5 µM ácido retinóico e 1mM 2-mercaptoetanol.

3 dias após a inoculação, o Meio 1 foi substituído por um outro meio (Meio 2), constituído por meio basal IMDM, suplementado com 10% FBS, 1% Penicilina/Estreptomicina (Gibco), 2mM L-glutamina (Sigma), 1 mM adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e 100 µM ascorbato-2-fosfato.

3 dias após a inoculação, o Meio 2 foi substituído por um outro meio (Meio 3), constituído por meio basal IMDM (Cambrex), suplementado com 10% FBS, 1%

Penicilina/Estreptomicina, 2mM L-glutamina, 1 mM adenosina monofosfato cíclico (cAMP, Sigma) e 10 μ M hidrocortisona.

Finalmente, 3 dias após a inoculação, o Meio 3 foi substituído por um outro meio (Meio 4), constituído por meio basal IMDM (Cambrex), suplementado com 10% FBS, 1% Penicilina/Estreptomicina, 2mM L-glutamina, 20 ng/mL de FGF-1, 10 ng/mL de SHH, 10 ng/mL de BDNF, 10 ng/mL de NGF, 25 ng/mL de vitronectina, 100 μ M ascorbato-2-fosfato, 100 μ M Isobutilmetilxantina, 10 μ M forskolina e 20nM PMA.

Em paralelo, foram inoculadas células controlo (sem diferenciação) à densidade 5000 células/cm², que foram mantidas em Meio 0 (ver protocolo de diferenciação cardiomiogénica). Decorrido o período de diferenciação, procedeu-se a um ensaio de imunofluorescência utilizando um anticorpo primário contra a β -Tubulina, tipo III, específica das células neuronais. Para efeitos de localização das células em cultura os núcleos celulares foram detectados com o fluorocromo DAPI, específico para os ácidos nucleicos. Tal como esperado, apenas as células que foram sujeitas ao protocolo de diferenciação neurogénica/glial, e que apresentavam à partida uma morfologia típica das células gliais (Fig. 7B), produziram sinal de fluorescência na reacção com o anticorpo primário contra a β -Tubulina III (Fig. 7D).

REFERÊNCIAS

Auger F. A., Germain L., Remy-Zolghadri M. e C. J. Hayward (2005). Method of isolating cells from umbilical cord. WO2005001081.

Barry F. P. e J. M. Murphy (2004) Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. Int. J. Biochem. & Cell Biol. 36:568-584.

Can A. and S. Karahuseyinoglu (2007). Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. Stem Cells (on line - www.StemCells.com); DOI:10.1634/stemcells.2007-0417.

Carvalho A. V., Lima, C., Basto V., Cunha C., Escada P., Cruz P. e H. Cruz (2007). Adult human neural stem/progenitor cells from the olfactory epithelium and olfactory lamina propria, isolation method, proliferation and differentiation in serum free culture medium and utilization for transplantation. WO2007020611.

Claes L., Eckert-Hubner K. E P. Augat (2002). The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. J. Orthop. Res. 20:255-266.

Cullinane D. M., Salisbury K. T., Alkhiary Y., Eisenberg S., Gerstenfield L. e T. A. Einhorn (2003). Effects of local mechanical environment on vertebrate tissue differentiation during repair: does repair recapitulate development? J. Exp. Biol. 206:2459-2471.

Chul-Won H. A., Yoon-Sun Y. e Y. Sung-Eun (2003) Isolation and culture-expansion methods of mesenchymal stem/progenitor cells from umbilical cord blood, and differentiation method of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem/projenitor into various mesenchymal tissues. WO 03070922.

Davies J. E., Dolores B., Raúl S., Morris H. e A. D. S. Lickorish (2004). Progenitor cells from Wharton's jelly of human umbilical cord. WO2004072273.

Deryl L. T. e M. L. Weiss (2008). Concise review: Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. Stem Cells, 26:591-599.

Do M., Jeong H., Choi B., Hunter L., Langley S., Pazmany L. e P. Trayhurn (2006). Inflammatory gene expression patterns revealed by DNA microarray analysis in TNF- α -trated SGBS human adipocytes. Yonsei Medical Journal, Vol. 47, N°5, 729-736.

Gardner T. N., Stoll T., Marks L., Mishra S. e M. K. Tate (2000). The influence of mechanical stimulus on the pattern of tissue differentiation in a long bone fracture - a FEM study. J. Biomech. 33:415-425.

Harris I. R., Messina D. J., Kihm A. e A. Seyda (2006). Postpartum cells derived from umbilical cord tissue, and methods of making and using the same. WO2006/071794.

Hung S.-C., Chen N.-J., Hsieh S.-L., Li H., Ma H.-L. e W.-H. Lo (2002). Isolation and Characterization of Size-Sieved Stem Cells from Human Bone Marrow. *Stem Cells* 20:249-258

Kadner A., Zund G., Maurus C., Breymann C., Yakarisik S., Kadner G., Turina M. e S. P. Hoerstrup (2004). Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: a comparative study. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 25:635-641.

Kotobuki N., Kawagoe D., Nomura D., Katou Y., Muraki K., Fujimori H., Goto S., Ioku K. e H. Ohgushi (2006). Observation and quantitative analysis of rat bone marrow stromal cells cultured *in vitro* on newly formed transparent β -tricalcium phosphate. *J. Mat. Sci.: Mat. Med.* 17:33-41.

Lee O. K., Kuo T. K., Chen W. M., Lee K. D., Hsieh S. L. E T. H. Chen (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 103:1669-1675.

Majumdar M. K., Thiede M. A. e J. D. Mosca (1998). Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J. Cell Physiol* 176:57-66.

Mitchell K. E., Weiss M. L., Mitchell B. M., Martin P., Davis D., Morales L., Helwig B., Beerenstrauch M., Abou-Easa K., Hildreth T. e D. Troyer (2003). Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* 21:50-60, 2003.

Nanaev A. K., Kohnen G., Milovanov A. P., Domogatsky S. P. e P. Kaufmann (1997). Stromal differentiation and

architecture of the human umbilical cord. Placenta 18:53-64.

Okada A., Shiomi T., Aoki Y. e M. Fujiwara (2005). Phenytoin stimulates chondrogenic differentiation in mouse clonal chondrogenic EC cells, ATDC5. J. Toxicol. Sci., Vol. 30, N° 3, 145-156.

Phan T. T. e I. J. Lim (2006). Isolation of stem/progenitor cells from amniotic membrane of umbilical cord. WO2004019357.

Pittenger M. F., Mackay A. M. e C. B. Beck (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284:143-147.

Purchio A. F., Naughton B. A. e J. San Roman (1998). Production of cartilage tissue using cells isolated from Wharton's jelly. WO199801779.

Roisen F. J., Klueber K. M., Lu C. L., Hatcher L. M., Dozier A., Shields C. B. e S. Maguire (2001) Adult human olfactory stem cells. Brain Res. 890:11-22.

Romanov Y. A., Svintsitskaya V. A. e V. N. Smirnov (2003). Searching fro alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells 21:105-110.

Seyda A. e A. Gosiewska (2006). Postpartum cells derived from umbilical cord tissue, and methods of making, culturing, and using the same. WO2006101548.

Shih D. T.-B., Lee D.-C., Chen S.-C., Tsai R.-Y., Huang C.-T., Tsai C.-C., Shen E.-Y. e W.-T. Chiu (2005). Isolation and Characterization of Neurogenic Mesenchymal Stem Cells in Human Scalp Tissue. *Stem Cells* 23:1012-1020.

Shim W. S. N., Jiang S., Wong P., Tan J., Chua Y. L., Tan Y. S., Sin Y. K., Lim C. H., Chua T., Teh M., Liu T. C. e E. Sim (2004). *Ex vivo* differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 324:481-488.

Wang H. S., Hung S. C., Peng S. T., Huang C. C., Wei H. M., Guo Y. J., Fu Y. S., Lai M. C. e C. C. Chen (2006). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the umbilical cord, *Stem Cells* 22:1330-1337.

Lisboa, 28 de Julho de 2008

REIVINDICAÇÕES

1- Método de selecção, simplificado e optimizado, para isolamento de células a partir do cordão umbilical humano, 100% eficaz em termos de número de amostras processadas, com rendimentos superiores ao anteriormente descrito no estado da arte em termos de número de células isoladas, rentável em termos de custo em relação ao tempo, consequentemente com aplicação industrial mais vantajosa, caracterizado por compreender, sequencialmente:

- a) Um passo de recolha onde o cordão umbilical humano é escurrido de sangue e transportado para o laboratório a seco, num recipiente estéril hermeticamente fechado, ou preferencialmente numa solução 186µg/ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 400µg /ml KCl, 60µg/ml KH_2PO_4 , 200µg/ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8000µg/ml NaCl, 350µg/ml NaHCO_3 , 90µg/ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2000µg/ml glucose, e 1% duma mistura equimolar de penicilina e estreptomicina, em ambiente estéril, preferencialmente à temperatura ambiente, se processado num período até 72h, ou a uma temperatura entre os 2 e os 8°C, preferencialmente 4°C, se processado num período entre as 48 e as 144h.
- b) Três passos de lavagem do cordão umbilical com uma solução 186µg/ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 400µg /ml KCl, 60µg/ml KH_2PO_4 , 200µg/ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8000µg/ml NaCl, 350µg/ml NaHCO_3 , 90µg/ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

- c) Um passo de eliminação da película exterior (membrana amniótica) com o auxílio de uma pinça estéril,
- d) Um passo de fraccionamento transversal do cordão umbilical em relação ao seu eixo longitudinal, consistindo de cortes produzidos com o auxílio dum bisturi, produzindo fracções com 2,5cm de comprimento,
- e) Um passo de eliminação de coágulos de sangue nas fracções resultantes de a), através de incisões provocadas por um bisturi, nos locais onde os coágulos foram identificados, e a partir das quais os coágulos são eliminados,
- f) Um passo de agrupamento das fracções resultantes de e) em grupos de 7, em que cada grupo é processado de forma independente nos passos seguintes,
- g) Um passo de dissociação das células a partir de cada grupo de 7 fracções de tecido, resultante de f), efectuada num recipiente estéril, selado com tampa estanque, numa solução de digestão com um pH controlado, através da acção conjunta da collagenase II, a uma concentração de 0,075% (peso/volume solução de digestão), com a tripsina, a uma concentração de 0,125% (peso/volume solução

de digestão), mantendo uma relação proporcional entre a massa de tecido, a área da superfície do fundo do recipiente onde assenta o tecido durante a digestão, o volume de solução digestão, e o volume total do recipiente, de aproximadamente 1:2:2:37, e onde o recipiente é incubado durante um período de tempo, em condições de temperatura, forma de dispersão de calor, humidade no ar, e agitação definidas; mais especificamente, partindo de 7 fracções de cordão umbilical, desprovidas de coágulos de sangue, com aproximadamente 2,5g cada, utilizando um volume de solução de digestão de 35ml, num frasco de cultura de tecidos fechado com tampa sem filtro, como seja um T₁₇₅, com um volume total interior de 650cm³, com um volume de ar remanescente após a adição da solução de digestão correspondente a 615cm³, menos o volume ocupado pelas 7 fracções de tecido, e onde a solução de digestão consiste, para além das enzimas, de 186µg/ml CaCl₂·2H₂O, 400µg/ml KCl, 60µg/ml KH₂PO₄, 200µg/ml MgSO₄·7H₂O, 8000µg/ml NaCl, 350µg/ml NaHCO₃, 90µg/ml NaH₂PO₄·7H₂O, 1000µg/ml glucose, e 76µg/ml (0,260mM) EDTA, mantendo-se um pH superior ou igual a 6,4, e onde a reacção enzimática é então incubada por um período de tempo correspondente a 4h, a uma temperatura constante de 37°C, dentro duma câmara de ar seco climatizada, e com uma agitação constante de 100 oscilações.min⁻¹ (opm).

- h) Um primeiro passo de recuperação das células dissociadas a partir do tecido em g), consistindo numa incubação estática, horizontal, do frasco de cultura de tecidos onde é processada a digestão, durante um período que pode variar entre 5 e 300 minutos, preferencialmente de 30 minutos, à temperatura e meio ambiente; numa pipetagem, evitando a sucção de resquícios de tecido não digerido, da solução de digestão para um tubo de centrifuga de 50mL; numa decantação dos resquícios de tecido não digerido; numa adição de 35ml de meio de cultura basal, ao frasco onde foi processada a digestão, suplementado com desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, glutamina, antibióticos e 10% de Soro Fetal Bovino (FBS); da substituição da tampa estanque do frasco por uma com filtro; numa incubação a 37°C, numa incubadora com uma atmosfera húmida, contendo 7% CO₂; e de mudanças da totalidade do meio de cultura em intervalos de 72h, por forma a promover uma fase de expansão/multiplicação das células que foram capazes de aderir ao suporte de cultura durante a incubação horizontal, até a cultura atingir a confluência máxima.
- i) Um segundo passo de recuperação das células dissociadas a partir do tecido em g), consistindo numa centrifugação do tubo de centrifuga de 50mL onde em h) foi decantada

a solução de digestão, a 350g, durante 10min, à temperatura ambiente; da pipetagem de 35ml do sobrenadante resultante da centrifugação para um frasco de cultura de tecidos, como seja um T₁₇₅, apetrechado com tampa com filtro; da adição de 35ml de meio de cultura basal, suplementado com desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, glutamina, antibióticos e 10% de Soro Fetal Bovino; duma incubação a 37°C numa incubadora com uma atmosfera húmida, contendo 7% CO₂; com mudanças da totalidade do meio de cultura em intervalos de 72h, por forma a promover uma fase de expansão/multiplicação das células que são capazes de aderir ao suporte de cultura, até a cultura atingir a confluência máxima.

- j) Um terceiro passo de recuperação das células dissociadas a partir do tecido em g), consistindo da congelação directa do sedimento celular resultante da centrifugação da solução de digestão realizada em i), utilizando um congelador com controlo da velocidade de congelação, com uma taxa de decréscimo de temperatura de 1°C.min⁻¹, até uma temperatura final de -80°C, em 2ml duma solução de Soro Fetal Bovino (FBS), com 10% Dimetilsulfóxido (DMSO), num criotubo estéril de 2,5mL, contendo, no final, 2ml de suspensão celular e aproximadamente 0,5cm³ de volume de ar remanescente.

- k) Um passo de criopreservação das populações de células, originárias de h) e i), após as respectivas culturas celulares atingirem confluências máximas, derivadas à adesão e expansão/multiplicação das células dissociadas na reacção de digestão efectuada em g), consistindo da congelação directa, na fase de vapor do azoto líquido, numa mistura de 0,5ml de suspensão celular, contendo o número de células desejado, e o mesmo volume numa solução de 10% Dimetilsulfóxido (DMSO) e 90% Soro Fetal Bovino (FBS), por forma a que no final a densidade da mistura corresponda a aproximadamente 3×10^6 células/ml, num criotubo estéril de 1.5mL, contendo, no final, 1ml de suspensão celular e aproximadamente $0,5\text{cm}^3$ de volume de ar remanescente.

2- Método de selecção, simplificado e optimizado, para isolamento de células a partir do cordão umbilical humano, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por originar uma população de células onde a maioria tem a capacidade de adesão e multiplicação numa superfície e meio de cultura adequados para células do tipo mesenquimatoso, onde a maioria das células expressa os marcadores de superfície celular CD44, CD73, CD90 e CD105, e onde a maioria das células apresenta apenas expressão residual dos marcadores de superfície celular CD14, CD31, CD34 e CD45, e onde as células apresentam capacidade de expansão que pode ir até 18 fases de adesão e expansão/multiplicação, mantendo uma taxa de

multiplicação constante de aproximadamente 1,7/24h, mantendo uma morfologia fibroblastóide constante, e onde as células mantêm a capacidade de diferenciação parcial ou terminal em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, cardiomiócitos, e células gliais.

3- Método de selecção, simplificado e otimizado, para isolamento de células a partir do cordão umbilical humano, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por permitir obter, em 9 dias, no final da primeira fase de adesão e expansão/multiplicação (P0), aproximadamente $8,6(\pm 0,1) \times 10^5$ células por grama de cordão umbilical.

4- Método de selecção, simplificado e otimizado, para isolamento de células a partir do cordão umbilical humano, de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por permitir obter, em 35 dias, um total de aproximadamente $7,7 \times 10^{15}$ células, utilizando inóculos iniciais constantes em todas as passagens (P) de $5,0 \times 10^3$ células/cm².

5- Método de selecção, simplificado e otimizado, para isolamento de células a partir do cordão umbilical humano, de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por permitir obter, em 65 dias, um total de aproximadamente $2,1 \times 10^{17}$ células, utilizando inóculos iniciais constantes em todas as passagens (P) de $2,0 \times 10^4$ células/cm².

6- Método de selecção, simplificado e otimizado, para isolamento de células a partir do cordão umbilical humano, de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por

ser aplicável a protocolos de terapia celular, como sejam, mas não limitados a, protocolos onde a células são administradas no paciente directamente após o isolamento, com ou sem criopreservação intermédia, com ou sem expansão intermédia, por via sistémica ou localizada, como seja uma administração intravenosa, injeção local, ou punção lombar, sem que as células sejam sujeitas a qualquer diferenciação prévia à sua administração no paciente.

7- Método de selecção, simplificado e optimizado, para isolamento de células a partir do cordão umbilical humano, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por se recorrer a uma acção terapêutica das células derivada da sua actividade adjuvante da multiplicação e diferenciação de outras células existentes no organismo, como sejam, mas não limitadas a, células precursoras ou estaminais em geral, células estaminais do tipo embrionário, células da linhagem hematopoiética, e células estaminais precursoras dos gâmetas adultos.

8- Método de selecção, simplificado e optimizado, para isolamento de células a partir do cordão umbilical humano, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por se recorrer a uma acção terapêutica das células derivada à capacidade das mesmas modularem o funcionamento do sistema imunitário, como seja através da síntese de moléculas, tais como, mas não limitadas a, citocinas e factores estimulantes da formação de colónias de macrófagos.

9- Utilização de peptidases de origem estritamente vegetal, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada por se

recorrer a uma acção terapêutica das células derivada à sua capacidade de, uma vez dentro do organismo, migrar e/ou aderir a áreas patologicamente afectadas, como sejam, mas não limitadas a, onde exista crescimento tumoral.

10- Método de selecção, simplificado e optimizado, para isolamento de células a partir do cordão umbilical humano, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelas células servirem de veículo para administração local de uma molécula ou um composto molecular, seja esta molécula, ou composto, natural ou sintético, como seja, mas não limitado a, uma proteína, um péptido, uma pequena molécula orgânica, um oligossacárido, um polissacárido, um proteoglicano, um lípido, ou qualquer combinação das anteriores, desde que com actividade terapêutica.

11 - Método de selecção, simplificado e optimizado, para isolamento de células a partir do cordão umbilical humano, de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizado por ser aplicável a protocolos de terapia celular, como sejam, mas não limitados a, protocolos onde as células são administradas no paciente, com ou sem criopreservação intermédia, com ou sem adesão e expansão/multiplicação intermédia, por via sistémica ou localizada, como seja uma administração intravenosa, injeção local ou punção lombar, após diferenciação induzida *in vitro* em qualquer outro tipo de células do corpo humano, precursoras ou terminalmente diferenciadas em células especializadas, como sejam, para além dos osteoblastos, condrócitos, adipócitos, cardiomiócitos, e células gliais; células de músculo liso, células de músculo esquelético, tenócitos, fibroblastos, células dos folículos capilares, células das glândulas

endócrinas e células de linhagem neural para além das células gliais, incluindo células neuro-precursoras e células do sistema nervoso, como neurónios, oligodendrócitos e astrócitos, células constituintes do epitélio conjuntivo, do epitélio da pele, do epitélio da córnea, do epitélio da retina, do epitélio do fígado, do epitélio do rim, do epitélio do pâncreas, do epitélio do intestino delgado, do epitélio do intestino grosso, do epitélio da bexiga e do epitélio uterino, do epitélio da faringe e do epitélio da laringe.

12- Método de selecção, simplificado e optimizado, para isolamento de células a partir do cordão umbilical humano, de acordo com as reivindicações 6 a 11, caracterizado por ser aplicável a protocolos de terapia celular onde as células, com ou sem criopreservação intermédia, com ou sem expansão intermédia, com ou sem diferenciação intermédia, são administradas de uma forma autóloga ou de uma forma alogénica.

13- Método de selecção, simplificado e optimizado, para isolamento de células a partir do cordão umbilical humano, de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizado por pelo desenvolvimento de uma composição farmacológica contendo as células, íntegras, sob a forma de extracto ou separadas em componentes.

14- Método de selecção, simplificado e optimizado, para isolamento de células a partir do cordão umbilical humano, de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizado pela utilização das células, íntegras, sob forma de extractos ou

em componentes, para a produção de superfícies e/ou camadas e/ou suportes para culturas de células de mamífero.

15- Método de selecção, simplificado e optimizado, para isolamento de células a partir do cordão umbilical humano, de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizado pela manipulação genética das células com vista a alterar o seu fenótipo, como seja a sua capacidade de adesão, e/ou expansão/multiplicação, e/ou diferenciação, como o fim de, mas não limitado a, desenvolver linhas celulares.

Lisboa, 28 de Julho de 2008

FIG. 1/7

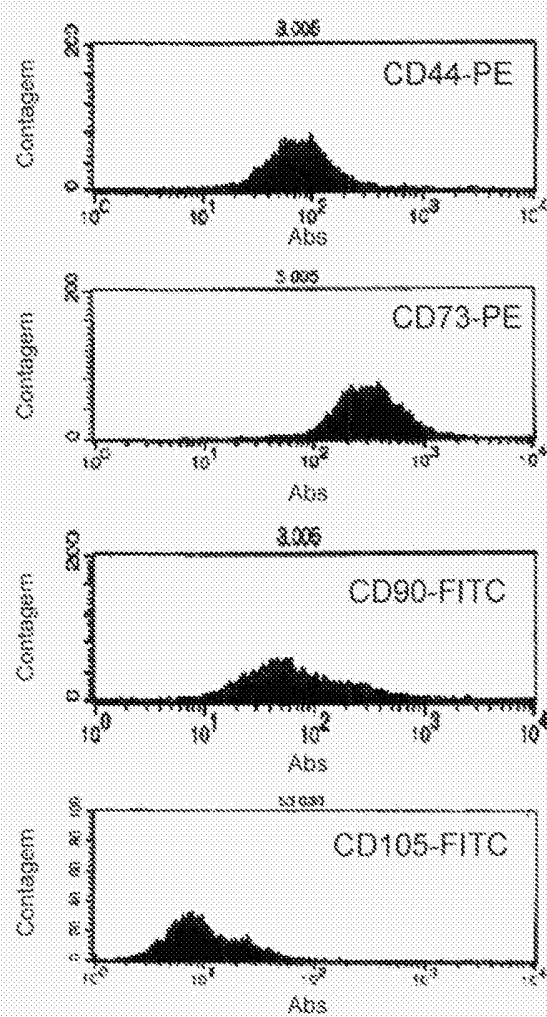


FIG. 2/7

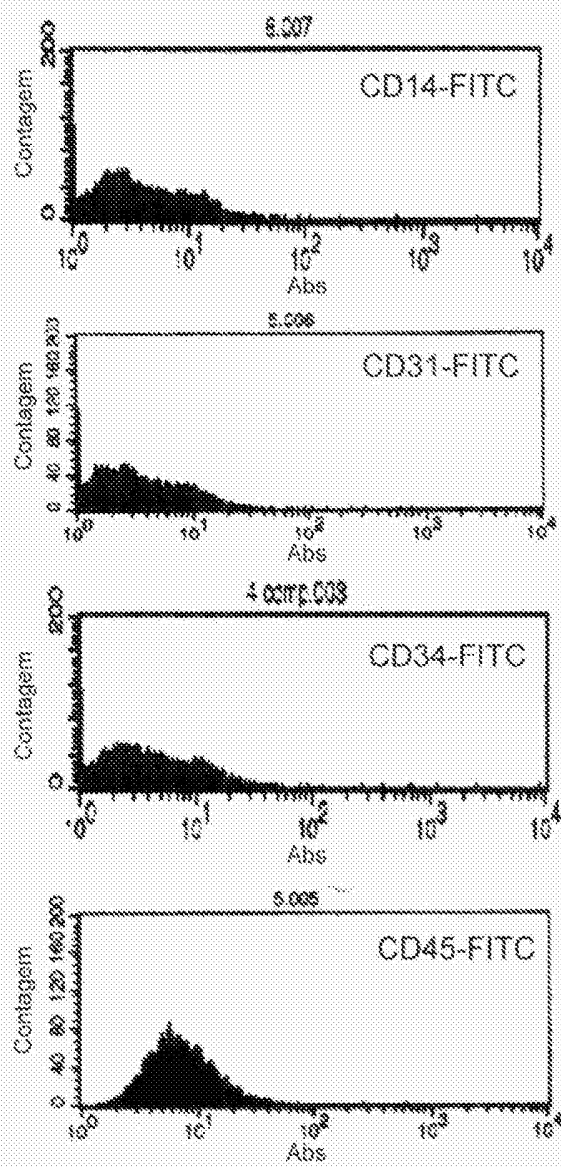


FIG. 3/7

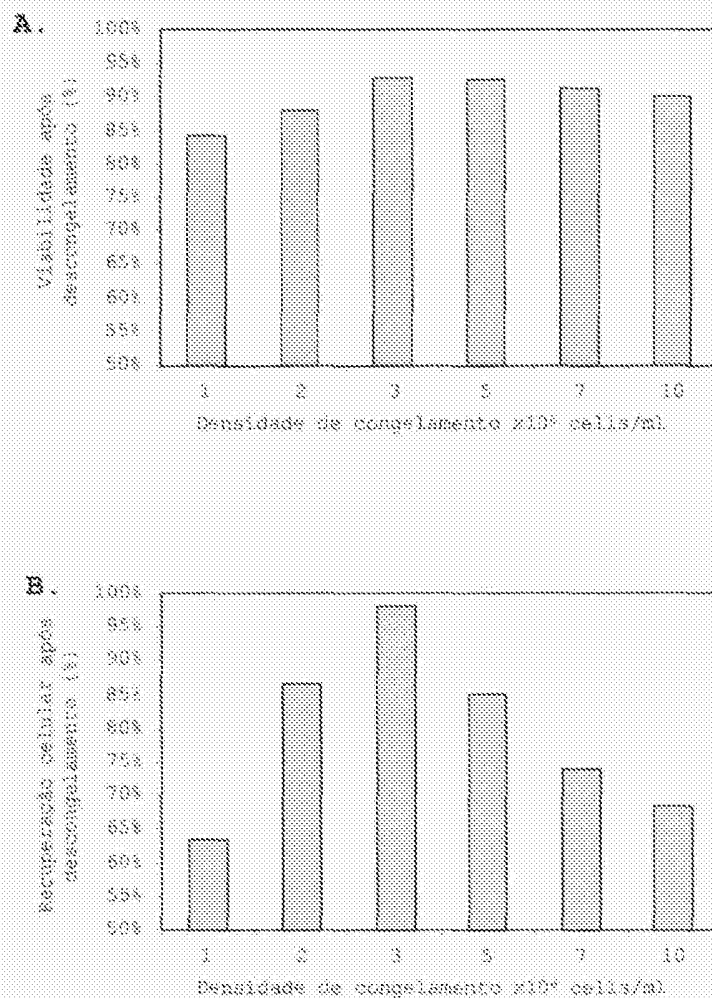
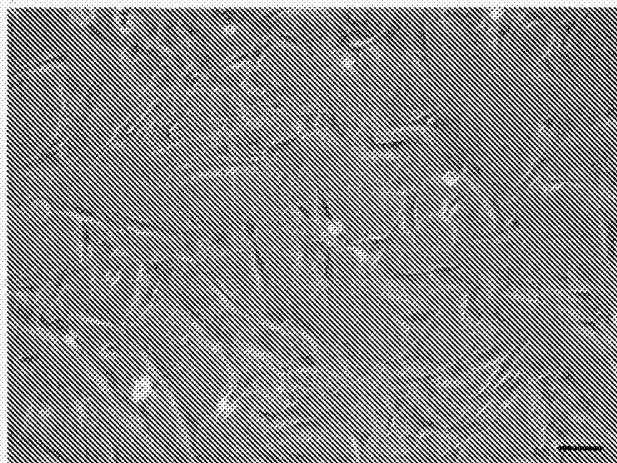


FIG. 4/7

A.



B.

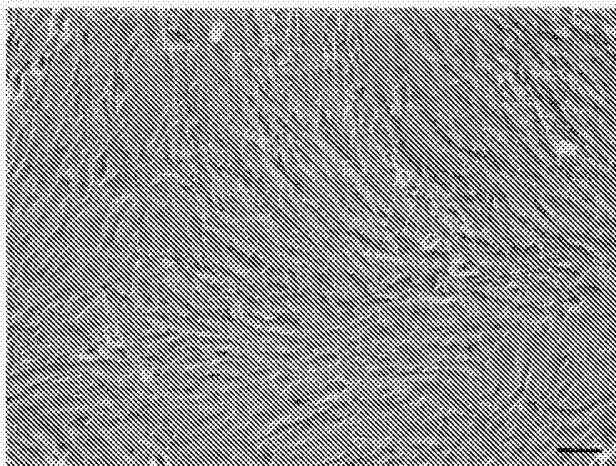
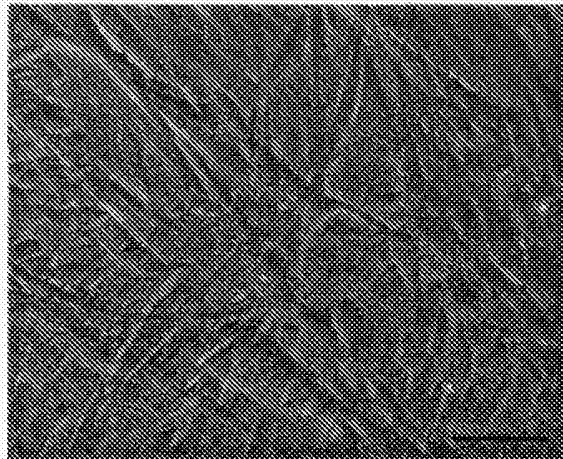
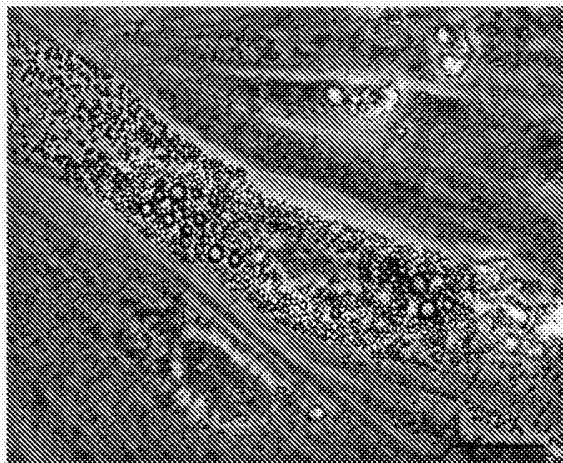
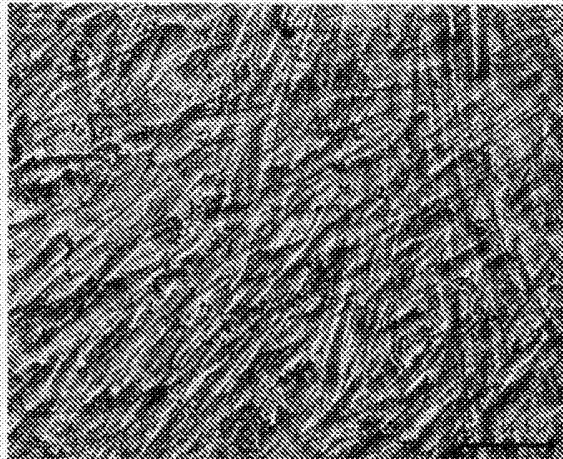


FIG. 5/7

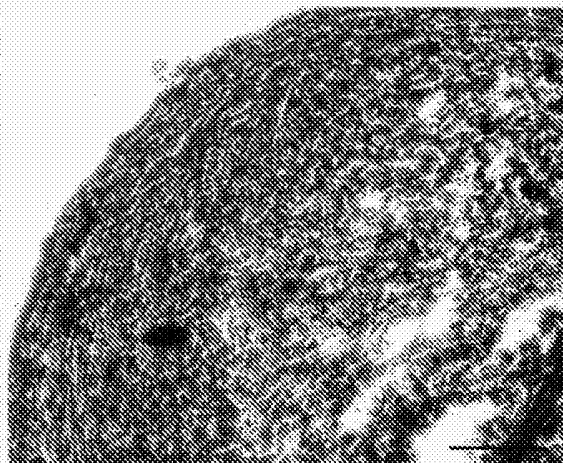
A.



B.



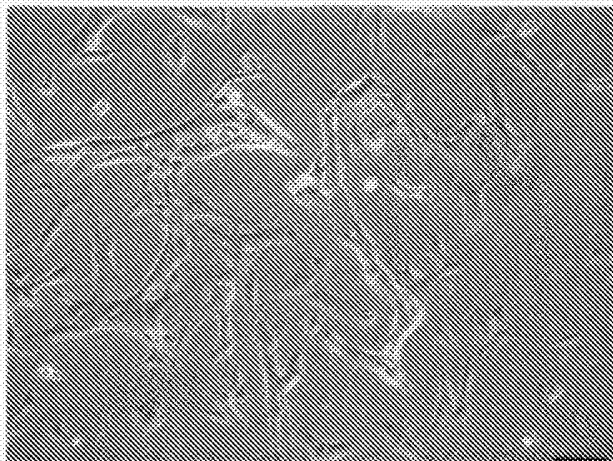
C.



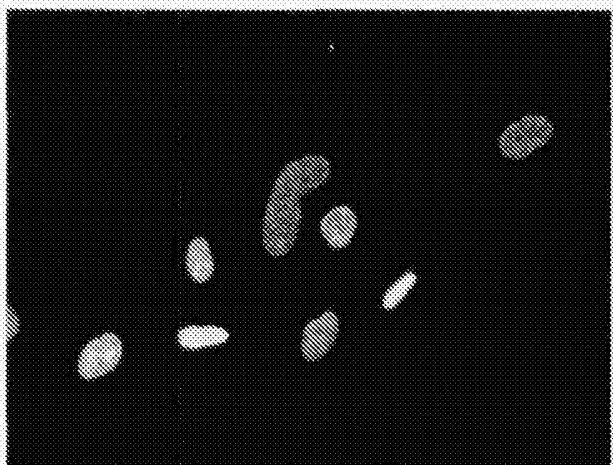
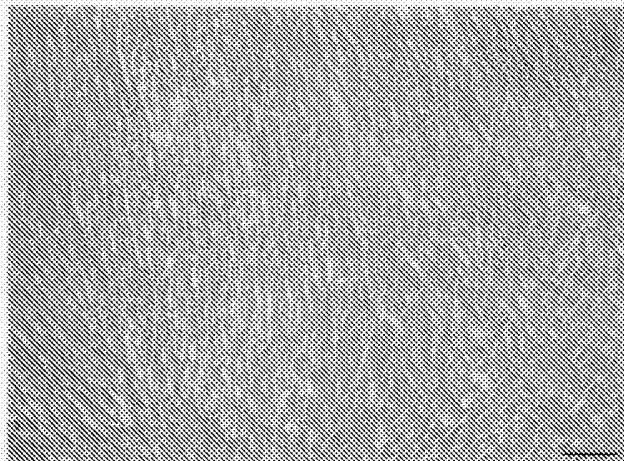
D.

FIG. 6/7

A.



B.



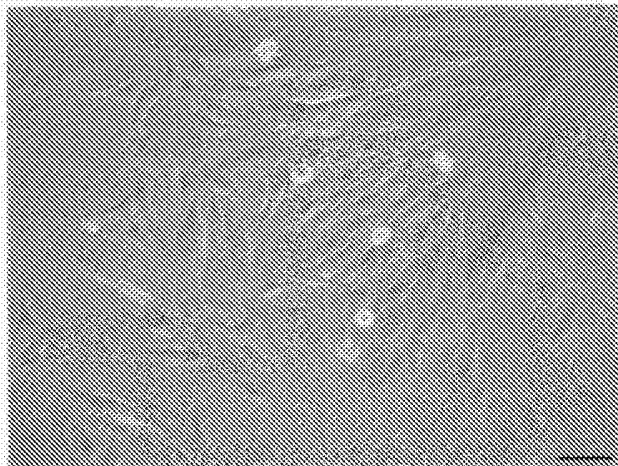
C.



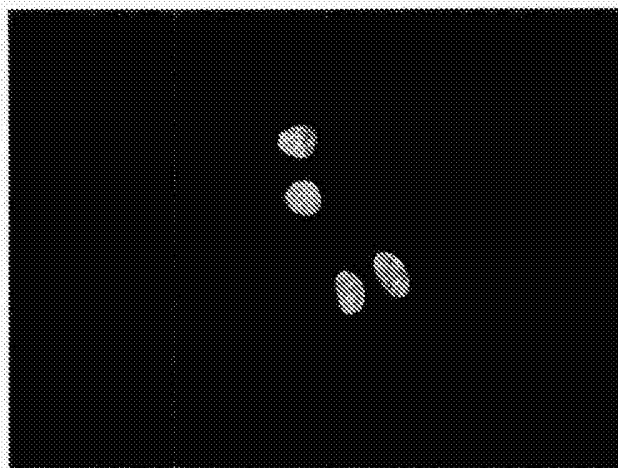
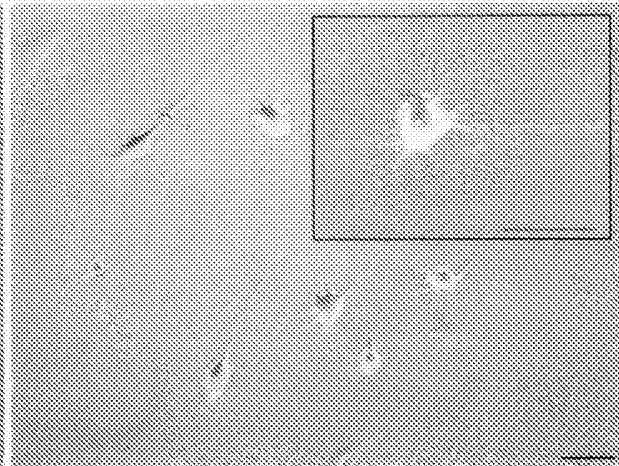
D.

FIG. 7/7

A.



B.



C.



D.