



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

(11) PI 0711599-7 B1



(22) Data do Depósito: 11/05/2007

(45) Data de Concessão: 02/03/2021

(54) Título: MÉTODOS PARA COLETA E DE USO DE CÉLULAS-TRONCO DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL DE PLACENTA

(51) Int.Cl.: A01N 1/02.

(30) Prioridade Unionista: 11/05/2006 US 60/799,734.

(73) Titular(es): HLI CELLULAR THERAPEUTICS, LLC..

(72) Inventor(es): NAOKO TAKEBE.

(86) Pedido PCT: PCT US2007011359 de 11/05/2007

(87) Publicação PCT: WO 2007/133665 de 22/11/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 11/11/2008

(57) Resumo: MÉTODOS PARA COLETA E DE USO DE CÉLULAS-TRONCO DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL DE PLACENTA. É descrito um método inovador de coleta de células-tronco de sangue de cordão umbilical a partir de uma placenta de mamífero isolada, não exsanguinada ou parcialmente exsanguinada, por perfusão placentária. A perfusão placentária pode incluir a perfusão da placenta isolada com um escoamento pulsátil de solução de perfusão, por exemplo, usando uma bomba ou dispositivo pulsátil ou peristáltico. As células-tronco podem, então, ser isoladas a partir do perfusato. A solução de perfusão pode incluir um anticoagulante. A placenta de mamífero isolada não necessita ser tratada com um anticoagulante antes da perfusão. A placenta isolada pode ser livre de um anticoagulante antes da perfusão.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: **"MÉTODOS
PARA COLETA E DE USO DE CÉLULAS-TRONCO DE SANGUE DE CORDÃO
UMBILICAL DE PLACENTA"**

Esse pedido reivindica o benefício do pedido
5 provisório norte-americano de número 60/799.734, depositado
em 11 de maio de 2006. A revelação do pedido provisório
anteriormente mencionado é aqui incorporada por referência
em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

10 A presente invenção se refere a um método eficiente
para a coleta de células-tronco do sangue de cordão
umbilical de placenta e a métodos para utilização das
células-tronco coletadas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

15 1. Campo da Invenção

A presente invenção se refere à coleta de células-
tronco a partir da placenta, detalhando um novo método, o
qual é clinicamente factível, conveniente e altamente
eficiente. Particularmente, a presente invenção descreve
20 uma nova descoberta, de que células sanguíneas residuais de
cordão umbilical de placenta recolhidas através de máquina
de perfusão pulsátil estão mais enriquecidas com fenótipos
de células-tronco hematopoiéticas primitivas, comparadas
àquelas que são recolhidas a partir de retirada por

agulha/seringa convencional ou coleta por drenagem gravitacional e permite que células do sangue de cordão umbilical sejam usadas para finalidades medicinais regenerativas. O aumento no número de células-tronco obtidas a partir de uma única placenta usando o método descrito também pode aperfeiçoar os resultados de transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas e evita o uso de enxertos duplos ou triplos de sangue de cordão umbilical a partir de diferentes doadores, a fim de compensar a insuficiência de células-tronco a partir de enxerto de um único doador.

2. Descrição da Técnica Anterior

Método de coleta de sangue de cordão umbilical e transplante de sangue de cordão umbilical em adultos.

Células umbilicais de CB (CB = sangue de cordão umbilical) são uma fonte promissora de HSC (HSC = células-tronco hematopoiéticas) para realizar transplante alogênico de HSC para malignidades hematológicas e síndrome de falência de medula óssea (Kurtzberg *et al.*, 1996; Wagner *et al.*, 1996; Gluckman *et al.*, 1997; Rubinstein *et al.*, 1998). Vantagens significativas incluem um rápido acesso a células CB, que estejam armazenadas em bancos de CB nacionais e a aceitação da não compatibilidade de enxertos relacionada a antígenos de leucócitos humanos 1-2, devido à severa e rara

doença de enxerto contra o hospedeiro (GVHD), comparado aos enxertos de doadores independentes compatíveis (Barker *et al.*, 2002). Células CB permitem que os pacientes escolham o transplante alogênico como uma opção curativa para

5 malignidades hematológicas, quando, de outra maneira, nenhum doador compatível adequado estiver disponível, particularmente entre pacientes em grupos minoritários. Apesar das vantagens acima, a aplicação de CB é limitada em adultos, devido aos números insuficientes de células,

10 incluindo células CD34+ e progenitoras. Transplante de CB usando baixos níveis de contagens de células nucleadas totais conduz a demoras significativas de enxertamento pós-transplante de neutrófilos e plaquetas ou a falhas de enxertamento (Wagner *et al.*, 2002; Laughlin *et al.*, 2004).

15 Procedimentos conhecidos para a coleta de CB incluem a drenagem do sangue por gravidade a partir da placenta parida, e a drenagem do sangue por punção venosa em bolsas ou seringas de coleta.

Uma vez que suprimentos de CB são escassos o

20 suficiente para serem usados somente uma vez ou, mais recentemente, usando suprimentos de CB duplos a partir de dois doadores não idênticos, transplantes de CB em adultos têm sido realizados, geralmente, sob uma base de pesquisa clínica somente quando doadores independentes aptos não

estiverem disponíveis. Na prática, uma recuperação de somente 20 - 40 mL não é incomum e essas células CB, portanto, não são sequer usadas ou armazenadas (Lasky et al., 2002; George et al., 2006). Em tais casos, uma
5 quantidade significativa de células CB não coletadas ainda permanece na placenta e são descartadas, uma vez que não existe qualquer método suplementar padronizado, que possa captá-las depois da coleta inicial para suplementá-la. Para expandir o conjunto de doadores do futuro banco de CB, é
10 importante investigar métodos de coleta de CB aperfeiçoados, incluindo como coletar as células CB residuais que são deixadas depois da coleta convencional de CB (Harris et al., 1994). De maneira mais importante, a disponibilidade de um aumento na quantidade de células CB a
15 partir da mesma placenta pode permitir o armazenamento de uma quantidade de células CB suficiente para múltiplas aplicações, incluindo cópia ou engenharia de enxerto, tal como uma expansão *ex vivo* e imunoterapia adotiva.

**Conhecimento corrente em plasticidade de HSC e regeneração
20 de tecidos.**

Durante a década passada, muitos tipos de células-tronco, que possuem a capacidade de se replicar, auto-renovar e se diferenciar, têm sido identificadas em seres humanos. Células-tronco totipotentes são capazes de formar

qualquer tipo de célula do corpo, e essas células estão dentro do embrião precoce e são as assim chamadas células ES humanas. Células-tronco pluripotentes são capazes de se desenvolver em endoderma, mesoderma ou ectoderma. Células-tronco específicas de tecido são encarregadas de produzir somente certos tecidos. Por exemplo, células-tronco hematopoiéticas (HSC) são responsáveis por todos os tipos de células do sangue, mas não são responsáveis por nenhum outro tipo de tecido, e sua presença continuada em um adulto permite uma capacidade de reparo. Entretanto, os investigadores têm constatado que células como HSC adultas, que foram consideradas como sendo responsáveis pela produção de diferentes tipos de células progenitoras hematopoiéticas, ainda deram origem a células de diferentes tecidos ou órgãos, tais como células neurais ou células musculares.

Estudos de pesquisa sobre transdiferenciação de HSC adultas continuam a ser controversos e investigações de pesquisa ativas estão em andamento. Ao contrário, inúmeros casos clínicos relataram evidência de geração de células não hematopoiéticas depois de transplante de BM ou de transplante cardíaco. Um estudo retrospectivo para procurar por transdiferenciação de BM no cérebro depois de transplante de BM mostrou evidência de neuropoiese,

detecção de astrócitos e microglias em um ajuste de longo prazo sem fusão celular (Cogle *et al.*, 2004). Outros relatos observaram a detecção de células de doador em osteoblastos, hepatócitos, epitélios de trato gastrointestinal (GI), estroma depois de transplante de BM; queratinócitos / hepatócitos / trato GI / epitélios de pele depois de transplante de células-tronco do sangue periférico; e cardiomiócitos com e sem endotélio depois de transplante cardíaco com uma ampla gama de quantidades percentuais encontrada (Hruban *et al.*, 1993; Theise *et al.*, 2000; Korbling *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2002; Quaini *et al.*, 2002).

Células do sangue de cordão umbilical como uma fonte de células-tronco adultas

Embora células ES humanas possam ser diferenciadas e expandidas *in vitro*, para produzir diferentes tipos de progenitores, sua aplicação em pacientes é atualmente impedida por múltiplas questões éticas. Além disso, a questão da pureza de células progenitoras derivadas de células-tronco embrionárias tem que ser resolvida. Ao contrário, constatou-se que populações de células-tronco adultas, derivadas a partir de tecidos hematopoiéticos, incluindo medula óssea e células CB umbilicais, são capazes de diferenciação em ectoderma ou endoderma quando da

exposição a estímulos adequados (Eglitis e Mezey, 1997; Brazelton *et al.*, 2000; Mezey *et al.*, 2000; Sanchez-Ramos *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005). Em particular, células-tronco derivadas de CB têm vantagens adicionais comparadas às outras fontes, uma vez que elas são coletadas a partir da placenta que é normalmente descartada, portanto, não exigindo qualquer dano ao tecido hospedeiro quando da coleta das células. Comparado às células BM, as CB tem ontogenia primitiva com *status* imune nativo e comprimento de telômero relativamente não encurtado.

Dentre os debates a respeito de, se células-tronco somáticas verdadeiramente pluripotentes existem, células derivadas a partir do CB e da placenta têm sido progressivamente focalizados como contendo propriedades interessantes para potencial exploração clínica. Recentemente, demonstrou-se que CB contém uma população de células heterogênea, e, é reconhecido como uma fonte de células-tronco pluripotentes (Goodwin *et al.*, 2001; Sanchez-Ramos *et al.*, 2001; Bicknese *et al.*, 2002; Sanchez-Ramos, 2002; Zigova *et al.*, 2002). Outros relataram que população de células aderentes isoladas a partir de uma cultura em suspensão de uma semana de duração de células de CB, depois de depleção de células positivas de linhagem, demonstraram expressar evidência imuno-histoquímica de

características ectodérmicas e endodérmicas (McGuckin et al., 2004). Existe uma série de relatos de transplantes de CB bem sucedidos em crianças sofrendo do distúrbio neurodegenerativo de leucodistrofia de Krabbe

5 (Escolar et al., 2005).

O presente inventor teorizou que essas características únicas encontradas em células-tronco de CB podem ser, partindo de um conceito emergente recentemente publicado, de que a placenta gestacional pode ser um nicho
10 hematopoiético durante o desenvolvimento embrionário (Gekas et al., 2005; Ottersbach e Dzierzak, 2005). É uma simples suposição de que uma placenta de longo prazo também pode conter células-tronco primitivas restantes aderentes ao nicho vascular, ou possivelmente devido ao estresse
15 associado com o "nascimento", pode haver um número aumentado de células-tronco em circulação que sejam liberadas a partir do BM ou fígado fetal, as quais tenham migrado para o nicho da placenta. Portanto, o presente inventor teorizou que células CB derivadas de placenta,
20 obtidas por esta inovação, podem conter mais células-tronco primitivas (células similares à célula ES), deixadas como células-tronco restantes, depositadas em um nicho de leito vascular de placenta, desde a embriogênese.

Isolamento e seleção de células CB primitivas incluindo células similares à célula ES e HSC primitivas

Para identificar marcadores de células-tronco comuns usando análise por comparação de padrões de expressão de gene a partir de células-tronco embrionárias, hematopoiéticas e neurais, somente um gene foi identificado (provavelmente, devido a dificuldades técnicas) (Fortunel *et al.*, 2003). Portanto, para identificar e selecionar células-tronco podem ser necessários vários marcadores para isolar essas células. Uma das características que podem ser usadas para distinguir células-tronco é a ausência de marcadores de diferenciação. Essa abordagem tem sido usada amplamente no campo de HSC para realizar o enriquecimento de células-tronco a serem empregadas em terapia. Essa característica "Linhagem negativa (Lin-)" é uma propriedade comum de muitas populações de células-tronco (Cai *et al.*, 2004b). Para enriquecimento adicional da população de células-tronco a partir de células CB de Lin-, relatou-se que o marcador de CD133+ demonstrou um elevado potencial de proliferação sobre a estimulação de fator de crescimento (Forraz *et al.*, 2004). Outros relataram que o subconjunto CD133+/CD34- poderia representar células-tronco mais primitivas, já que elas não produzem células formadoras de colônia (CFC) em metilcelulose, mas exibiram a mais elevada

frequência de células de repopulação de SCID (Kuci *et al.*, 2003). Marcadores de células-tronco embrionárias, tais como antígeno embrionário específico quanto ao estágio (SSEA)-3, SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81 são expressos somente em
5 células ES, que tenham sido amplamente usadas na caracterização de célula-tronco pluripotente e anticorpos compatíveis para análise FACS (os quais estão comercialmente disponíveis). Mais recentemente, Kucia *et al.* descreveram uma população de células-tronco chamada de
10 "células-tronco similares a embrionárias muito pequenas (VSEL)", que portam o fenótipo Lin-/CD45-/CXCR4+/CD133+/CD34+ (Kucia *et al.*, 2006). Essas células eram também positivas para fatores de transcrição embrionários Oct-4 e Nanog.

15 Alternativamente, o método usando a presença de marcadores metabólicos gerais também tem sido usado para identificar e isolar células-tronco. Um dos marcadores metabólicos que tem sido descrito, é o aldeído desidrogenase (ALDH) (Takebe *et al.*, 2001). O substrato
20 fluorescente de ALDH, Aldefluor (StemCell), tem sido usado para demonstrar a atividade de ALDH aumentada em células-tronco neurais (Cai *et al.*, 2004b; Corti *et al.*, 2006) e HSC (Storms *et al.*, 1999). Esse método de marcação vivo, não tóxico, pode ser usado para identificar outras

populações de células-tronco (Cai *et al.*, 2004a). Além disso, a assimilação de rodamina e marcação com corante Hoechst têm sido usadas para selecionar populações de células-tronco a partir de BM, CB, mesenquimais, músculo e de cérebro adulto (Kim *et al.*, 2002; Bhattacharya *et al.*, 2003; Migishima *et al.*, Parmar *et al.*, 2003). A população lateral (SP), que é demonstrada por baixa assimilação de corante Hoechst 33342, representa a mais elevada capacidade de auto-renovação e de pluripotência. A assimilação de corante Hoechst é regulada por um transportador de membrana ABCG2 e a população SP é definida como a expressão de proteína ABCG2 (Zhou *et al.*, 2001; Scharenberg *et al.*, 2002). Proteína ABCG2 é também expressa de maneira específica em células-tronco neurais e diminui em expressão, quando células de precursor se diferenciam (Cai *et al.*, 2002).

Evidência de transdiferenciação de células ectodérmicas a partir de linhagem de células hematopoiéticas humanas.

Existem relatos crescentes de progenitores derivados de estroma de BM que se diferenciam em células neurais, desde que essas células foram relatadas pela primeira vez a mostrarem diferenciação em músculo, glia e hepatócitos em camundongos (Azizi *et al.*, 1998; Ferrari *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 1999). Evidência *in vitro* de induções de

proteínas específicas para neurônios, tais como nestina, proteína nuclear específicas para neurônio (neuN) e proteína fibrilar ácida glial (GFAP) em células derivadas a partir de células estromais BM de roedores e seres humanos foram relatadas depois de estimulação com ácido retinóide, fator de crescimento epidérmico (EGF) ou fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Sanchez-Ramos *et al.*, 2000). Dentre progenitores hematopoiéticos não mesenquimais, vários relatos mostraram que células mononucleares CB humanas, incluindo células CD133+ separadas, foram induzidas a expressar marcadores neuronais e gliais *in vitro*, tais como beta-tubulina III e GFAP, depois de exposição a fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) e hEGF, e também Musashi-1 depois de exposição a ácido retinóico e a fator de crescimento de nervo (NGF) (Sanchez-Ramos *et al.*, 2001; Bicknese *et al.*, 2002).

Evidência de transdiferenciação endodérmica a partir de linhagem de células hematopoiética.

Previamente, pensava-se que hepatócitos eram transformados a partir de células BM infundidas em um modelo de camundongo (Lagasse *et al.*, 2000), mas constatou-se que isto era causado por fusão celular naquele modelo de regeneração de fígado particular (Wang *et al.*, 2003b). Outros também constataram que células mielomonocíticas, a

partir de fonte de BM HSC, foram a fonte principal de parceiros de fusão de hepatócitos (Camargo *et al.*, 2004). Células CB isoladas a partir de um procedimento de depleção de células positivas de linhagem seguido por uma semana de cultivo em suspensão formaram uma população de células aderentes, que foram constatadas a expressar marcadores para células hepáticas depois de incubação adicional com meio de crescimento de hepatócito (McGuckin *et al.*, 2005). Evidência *in vivo* de desenvolvimento de células similares a hepatócitos no fígado tratado com CCl₄, em camundongos imuno-deficientes depois de transplante de CB CD34+.CD38-CD7 foi relatada (Wang *et al.*, 2003a), e mais recentemente em um modelo de não lesão usando ovelha fetal, hepatócitos humanos foram gerados através de reconstituição de BM de ovelha fetal por HSC humanas, incluindo CD34+/Lin-, CD34-/Lin-, CD34+/Lin-/CD38-, CD34-/Lin-/CD38-, CD34+/Lin-/CD133+, CD34+/Lin-/CD133- derivadas a partir de BM, de sangue periférico ou de CB (Almeira-Porada *et al.*, 2004).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a um método inovador de coleta de células-tronco derivadas de sangue de cordão umbilical (CB) a partir de uma placenta. Em uma modalidade da invenção, a perfusão da placenta pode ser realizada por perfusão de placenta com máquina pulsátil (PMPP). PMPP pode

ser combinada com qualquer complemento de um método de coleta convencional, usualmente punção venosa (aspiração de vasculatura de cordão umbilical com uma agulha e seringa) ou drenagem por gravidade, ou nenhuma coleta prévia. PMPP
5 pode ser realizada com um anticoagulante contendo solução de perfusão do órgão para remover por jateamento as células do sangue de cordão umbilical e, subsequentemente, coletar o perfusado contendo células-tronco resultantes. Esse método não exige qualquer preparação ou injeção de
10 anticoagulantes na placenta depois do parto para prevenir a coagulação. A placenta isolada pode ser resfriada, por exemplo, por colocação em gelo, antes da perfusão. Se a perfusão for realizada dentro de uma hora do isolamento da placenta, esta não necessita ser resfriada antes da
15 perfusão. O método presentemente descrito ainda pode ser realizado se a placenta for preparada ou injetada com um anticoagulante antes de realizar a perfusão. Se as células do sangue de cordão umbilical forem primeiramente coletadas usando-se métodos convencionais, as células do sangue de
20 cordão umbilical residuais obtidas com PMPP podem ser adicionadas a esta coleção inicial. As células do sangue de cordão umbilical obtidas por PMPP também podem ser armazenadas como células de cópia ou armazenadas para finalidades de futura engenharia de enxerto de células e de

medicina regenerativa. A conveniência de não se necessitar de remoção imediata de células-tronco do sangue de cordão umbilical a partir da placenta e a capacidade de despachá-la diretamente sobre gelo somente, sem quaisquer
5 preparações adicionais, para uma instalação central, torna esse método potencialmente atraente a ser incorporado ao sistema de bancos de células de sangue de cordão umbilical atualmente estabelecidos.

Uma modalidade compreende um método de coleta de
10 células-tronco de sangue de cordão umbilical a partir de uma placenta de mamífero isolada não exsanguinada ou parcialmente exsanguinada.

Outras modalidades podem compreender a realização de perfusão de placenta em uma placenta de mamífero com uma
15 solução de perfusão, por exemplo, pelo menos um primeiro volume de solução de perfusão, para produzir um perfusado compreendendo células-tronco de sangue de cordão umbilical; coleta do perfusado compreendendo células-tronco de sangue de cordão umbilical; e isolamento de células-tronco de
20 sangue de cordão umbilical a partir do perfusado para produzir células-tronco de sangue de cordão umbilical isoladas. A perfusão pode compreender perfusão com um ou mais volumes de solução de perfusão, por exemplo, desde 1 a 3 volumes de solução de perfusão.

Em algumas modalidades, a perfusão compreende submeter a placenta de mamífero não exsanguinada ou parcialmente exsanguinada a um escoamento mediado por pressão de solução de perfusão. Em certas modalidades, escoamento mediado por
5 pressão de solução de perfusão compreende um escoamento pulsátil de solução de perfusão. Em algumas modalidades, o escoamento mediado por pressão de solução de perfusão compreende um ou mais de um escoamento mediado por pressão positiva de solução de perfusão ou de um escoamento mediado
10 por pressão negativa de solução de perfusão.

Em algumas modalidades, o método compreende submeter a placenta de mamífero não exsanguinada ou parcialmente exsanguinada a um escoamento mediado por pressão de perfusado, por exemplo, via perfusão pulsátil, na qual a
15 perfusão é realizada sob condições suficientes para obter uma placenta de mamífero substancialmente livre de células-tronco do sangue de cordão umbilical. Em outras modalidades, a perfusão da placenta é realizada usando-se uma bomba peristáltica.

20 De maneira geral, o método envolve o isolamento de células-tronco presentes no sangue de cordão umbilical de uma placenta isolada. As células-tronco isoladas podem compreender células-tronco similares a células-tronco embrionárias (ES), células-tronco hematopoiéticas, células-

tronco mesenquimais ou combinações destas. Outras células de cordão umbilical, que podem ser obtidas por esse método, incluem células T, monócitos, células dendríticas e células B.

5 Em outras modalidades, o método pode compreender adicionalmente: antes de se realizar a perfusão, isolar uma placenta de mamífero a partir de um doador mamífero para obter uma placenta de mamífero isolada; e resfriar a placenta de mamífero isolada, para obter uma placenta de
10 mamífero resfriada.

 Em várias modalidades, a placenta isolada é resfriada ou mantida sobre gelo depois da aquisição, e antes da perfusão. Em algumas modalidades, a placenta isolada resfriada é mantida em uma temperatura variando desde cerca
15 de $> 0^{\circ}\text{C}$ a cerca de 6°C , ou desde cerca de 1°C a cerca de 4°C , contanto que não se permita que a placenta congele, antes de se realizar a perfusão. Em outras modalidades, a placenta é mantida em uma temperatura variando desde cerca
20 de 4°C a cerca de 10°C durante quatro horas, antes de se realizar a perfusão. Em uma modalidade, a placenta é mantida a 4°C , antes de se realizar a perfusão. Em certas modalidades, a placenta resfriada isolada é mantida durante um período de tempo de até cerca de 40 horas, depois da aquisição e antes da perfusão.

Em algumas modalidades, o método não exige a administração ou injeção de um anticoagulante na placenta antes da perfusão. Em uma modalidade, não se administra ou se injeta na placenta um anticoagulante antes da perfusão.

5 Em algumas modalidades, a solução de perfusado compreende uma solução Belzer fisiologicamente compatível (uso não humano de RPMI ou IMDM). Em outras modalidades, a solução de perfusado compreende um anticoagulante. Em certas modalidades, a solução de perfusado compreende um
10 anticoagulante selecionado a partir de heparina, creatina fosfato dextrose (CPDA) ou qualquer combinação de dois ou mais destes.

Em algumas modalidades, a placenta é parcialmente exsanguinada antes de se realizar a perfusão da placenta.
15 Em geral, o sangue de cordão umbilical pode ser exsanguinado a partir da placenta usando-se métodos padrão, tais como punção venosa (por exemplo, por agulha e seringa) ou drenagem por gravidade (por exemplo, por agulha e bolsa).

20 Geralmente, células-tronco podem ser isoladas a partir do sangue do cordão umbilical exsanguinado a partir da placenta por tais métodos padrão. Em algumas modalidades da invenção, células-tronco isoladas a partir da placenta exsanguinada usando-se métodos padrão podem ser combinadas

com células-tronco isoladas usando-se os métodos de perfusão da invenção. Em algumas modalidades, as células-tronco combinadas a partir de ambos os métodos podem ser usadas para derivar ontogenia de células-tronco adicionais.

5 Em uma modalidade, a placenta é perfundida via artérias umbilicais e via umbilical. Em algumas modalidades, a placenta é perfundida e o sangue de cordão umbilical é removido, compreendendo células-tronco viáveis, até cerca de 40 horas depois do parto. Em certas
10 modalidades, a placenta é perfundida, e o sangue de cordão umbilical é removido, compreendendo células-tronco viáveis, entre cerca de 6 horas e cerca de 40 horas depois do parto.

 Em algumas modalidades, a PMPP da placenta fixada é realizada em um ajuste de pulso de cerca de 15 a 60
15 batimentos/min. Em certas modalidades, a PMPP da placenta fixada é realizada em uma pressão sistólica variando desde 15 a 70 mmHg. Ainda em outras modalidades, a PMPP da placenta fixada é realizada durante um tempo variando desde
20 5 minutos a 90 minutos, durante cujo tempo o sangue do cordão umbilical é removido a partir da placenta. Em algumas modalidades, a PMPP da placenta fixada é realizada durante um tempo variando desde 15 minutos a 35 minutos. Em outras modalidades, a PMPP da placenta fixada é realizada durante um tempo variando desde 20 minutos a 30 minutos. Em

mais modalidades, a PMPP da placenta fixada é realizada durante um período de tempo mínimo selecionado a partir de pelo menos 10 minutos, pelo menos 15 minutos, pelo menos 20 minutos, pelo menos 25 minutos, pelo menos 30 minutos, pelo menos 40 minutos, pelo menos 50 minutos e pelo menos 60 minutos, sendo que o tempo de perfusão máximo não é maior do que 90 minutos para o período de tempo mínimo selecionado.

Em certas modalidades, os fenótipos de células-tronco hematopoiéticas primitivas isoladas compreendem uma ou mais de células CD34+/CD38-, células CD133+, células CD133+/CD34+, células CD133+/CD34-, células CD117+, células CD90+, células CD59+, células Thy1+, células Lin-, células CXCR4+, células ALDH^{high}, células de população lateral (SP), células SSEA-3+, células SSEA-4+, células TRA-1-60, células TRA-1-81 ou combinações destas. Em outras modalidades, as células-tronco isoladas compreendem fenótipos de células-tronco hematopoiéticas primitivas, que podem se diferenciar em células diferentes de células CD34+/CD38-, células CD133+, células CD133+/CD34+ ou células CD133+ / CD34-.

Em uma modalidade, um método de coleta de células-tronco do sangue de cordão umbilical é descrito, o qual pode compreender ou consistir em fornecimento de uma placenta de mamífero não exsanguinada ou parcialmente

exsanguinada, compreendendo sangue de cordão umbilical
compreendendo célula-tronco de sangue de cordão umbilical;
perfusão da placenta de mamífero não exsanguinada ou
parcialmente exsanguinada com um escoamento mediado por
5 pressão de uma solução de perfusão, para produzir um
perfusado compreendendo sangue de cordão umbilical,
compreendendo células-tronco de sangue de cordão umbilical;
coleta do perfusado; e isolamento das células-tronco do
sangue de cordão umbilical do perfusado, para produzir
10 células-tronco de sangue de cordão umbilical isoladas. As
células-tronco de sangue de cordão umbilical isoladas podem
ser criopreservadas.

Em outra modalidade, um método de coleta de células-
tronco do sangue de cordão umbilical é descrito, o qual
15 pode compreender ou consistir em fornecimento de uma
placenta de mamífero não exsanguinada isolada compreendendo
sangue de cordão umbilical compreendendo células-tronco de
sangue de cordão umbilical; exsanguinando-se parcialmente a
placenta de mamífero não exsanguinada isolada, para obter
20 uma placenta parcialmente exsanguinada e um volume de
sangue de cordão umbilical compreendendo células-tronco de
sangue de cordão umbilical; perfusão da placenta de
mamífero parcialmente exsanguinada com um escoamento
mediado por pressão de uma solução de perfusão, para

produzir um perfusado compreendendo sangue de cordão umbilical compreendendo células-tronco de sangue de cordão umbilical; coleta do perfusado; e isolamento das células-tronco de sangue de cordão umbilical do volume de sangue de cordão umbilical e do perfusado, para produzir células-tronco do sangue de cordão umbilical isoladas. As células-tronco do sangue de cordão umbilical isoladas podem ser criopreservadas.

Em algumas modalidades, o perfusado de PMPP mais aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical com um método de exsanguinação convencional, tal como com agulha e seringa, resulta em um aumento de cerca de 1,5 vezes da contagem de células mononucleares totais obtidas a partir de uma placenta, comparada à aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical com uma agulha e seringa isoladamente. Uma recuperação de células totais comparável é possível se a placenta não for exsanguinada antes de se realizar o método de perfusão da invenção.

Em uma modalidade, o perfusado de PMPP mais a aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical com um método de exsanguinação convencional, tal como com agulha e seringa, resulta em um aumento de percentagem de 5,5 vezes de células CD34+

obtidas, comparada à aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical com uma agulha e seringa isoladamente. Uma recuperação de células totais comparável é possível se a placenta não for exsanguinada antes de se realizar o método de perfusão da invenção.

Em outra modalidade, o perfusado de PMPP mais a aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical com um método de exsanguinação convencional, tal como com agulha e seringa, resulta em um aumento de cerca de 4,9 vezes de células CD34+ totais obtidas, comparada à aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical com uma agulha e seringa isoladamente. Uma recuperação de células totais comparável é possível se a placenta não for exsanguinada antes de se realizar o método de perfusão da invenção.

Ainda em outra modalidade, o perfusado de PMPP mais a aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical com um método de exsanguinação convencional, tal como com agulha e seringa, resulta em uma percentagem de população de células CD34+/CD38- obtidas aumentada em cerca de 14,8 vezes, comparada à aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical com agulha e seringa isoladamente. Uma recuperação de células totais comparável é possível se a

placenta não for exsanguinada antes de se realizar o método de perfusão da invenção.

Ainda em outra modalidade, o perfusado de PMPP mais a aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical com um método de exsanguinação convencional, tal como uma agulha e seringa, resulta em cerca de 11 vezes mais células CD34+/CD38- sendo coletadas, comparado à aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical com agulha e seringa isoladamente. Uma recuperação de células totais comparável é possível se a placenta não for exsanguinada antes de se realizar o método de perfusão da invenção.

Em uma modalidade adicional, na qual o perfusado de PMPP mais a aspiração de sangue de cordão umbilical a partir das vasculatura umbilical com um método de exsanguinação convencional, tal como uma agulha e seringa, resulta em uma percentagem cerca de 5 vezes enriquecida de células CD133+ obtidas , comparada à aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical com agulha e seringa isoladamente. Uma recuperação de células totais comparável é possível se a placenta não for exsanguinada antes de se realizar o método de perfusão da invenção.

Ainda em outra modalidade, o perfusado de PMPP mais a aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura com um método de exsanguinação convencional, tal como com agulha e seringa, resulta em população de 5 células CD133+ cerca de 7 vezes mais elevada, comparada à aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical com agulha e seringa isoladamente. Uma recuperação de células totais comparável é possível se a placenta não for exsanguinada antes de se realizar o 10 método de perfusão da invenção.

Em outras modalidades, as células-tronco do sangue de cordão umbilical podem ser criopreservadas.

Em algumas modalidades, a invenção descrita inclui um método para o tratamento de um mamífero que necessite de 15 reconstrução hematopoiética, compreendendo (a) o isolamento de células-tronco hematopoiéticas derivadas do sangue de cordão umbilical de placenta, de acordo com um método aqui descrito e (b) o cultivo *in vitro* das células-tronco hematopoiéticas isoladas de acordo com um método aqui 20 descrito, por meio do que se produz células-tronco de progenia. Em certas modalidades, essas células-tronco de progenia podem ser usadas imediatamente ou armazenadas, por exemplo, por criopreservação, para uso futuro, tal como em uma unidade para a entrega a um paciente que delas

necessite. Em outras modalidades, o método pode compreender adicionalmente (c) a introdução no mamífero de uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz das células-tronco de progenia, por meio do quê a reconstituição hematopoiética é efetuada. Em algumas modalidades, o mamífero é escolhido a partir de um ser humano ou de um primata, por exemplo, tal como um babuíno ou outros primatas.

Em outras modalidades, a invenção descrita inclui um método para o tratamento de um mamífero que necessite de reconstituição hematopoiética, compreendendo (a) o isolamento de células-tronco hematopoiéticas derivadas a partir de sangue de cordão umbilical de placenta de acordo com um método aqui descrito e (b) a introdução no mamífero de uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz das células-tronco hematopoiéticas isoladas, por meio do quê a reconstituição hematopoiética é efetuada. Em algumas modalidades, o mamífero é escolhido a partir de um ser humano ou de um primata, por exemplo, tais como um babuíno ou outros primatas.

Em modalidades adicionais, o método para o tratamento de um mamífero que necessite de reconstituição hematopoiética pode compreender adicionalmente a criopreservação das células-tronco isoladas, antes que

elas, ou suas células de progenia derivadas, sejam introduzidas em um mamífero que delas necessite. Em modalidades adicionais, as células-tronco isoladas, ou suas células de progenia derivadas, que são introduzidas em um mamífero que delas necessita, podem ser alogênicas, autólogas ou uma combinação destas, em relação ao mamífero que recebe as células. Em certas modalidades, as células-tronco isoladas a partir de mais do que uma placenta podem ser reunidas em conjunto para uso no tratamento de um mamífero que delas necessite. Em outras modalidades, a progenia derivada a partir de células-tronco isoladas de uma placenta isolada podem ser reunidas em conjunto com progenia derivada a partir de uma ou mais placentas isoladas adicionais para uso no tratamento de um mamífero que delas necessite.

Em algumas modalidades, o método para tratamento de um mamífero que necessite de reconstituição hematopoiética envolve um mamífero que tenha anemia aplásica, uma malignidade hematopoiética, uma doença auto-imune, um distúrbio genético, uma imunodeficiência, um tumor sólido maligno ou uma combinação destes.

Em certas modalidades, o mamífero que necessite de reconstituição hematopoiética tem uma malignidade hematopoiética selecionada a partir de leucemia, linfoma,

mieloma múltiplo, síndrome mielodisplásica. Em outras modalidades, o mamífero que necessite de reconstituição hematopoiética tem uma imunodeficiência resultando de irradiação, quimioterapia, infecção por um microorganismo patogênico ou uma combinação destes.

Em uma modalidade, a invenção descrita inclui um método para a regeneração de tecido lesionado em um mamífero que dela necessite, compreendendo: (a) o cultivo *in vitro* das células-tronco de sangue de cordão umbilical isoladas, de acordo com a reivindicação 1, por meio do que se produz células diferenciadas ou células-tronco expandidas; e (b) a introdução no mamífero, intravenosamente ou por injeção direta no órgão alvo, de uma composição compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz das células diferenciadas ou células-tronco expandidas, por meio do que a regeneração de tecidos é efetuada. Em outra modalidade, um método é descrito para a regeneração de tecido lesionado em um mamífero que dela necessite, compreendendo a introdução no mamífero, intravenosamente ou por injeção direta no órgão alvo, de uma composição compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz das células-tronco de cordão umbilical isoladas de acordo com a reivindicação 1, por meio do que a regeneração de tecido é efetuada.

Em outras modalidades, um método é descrito para a regeneração de tecido lesionado em um mamífero que dela necessite, sendo que o tecido compreende um ou mais de tecido cardíaco, tecido de músculo, tecido de fígado, pele, 5 tecido neural, tecido ósseo, epitélios, estroma ou endotélio.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Na descrição detalhada da invenção apresentada abaixo, referência é feita aos desenhos anexos, nos quais:

10 Figura 1. Perfusão de placenta por máquina pulsátil (PMPP) permite aumento de 1,5 vezes da contagem de células mononucleares totais por placenta (fração de punção venosa mais fração de PMPP) comparada à punção venosa isoladamente. A figura representa uma análise de 8 amostras 15 de CB derivadas de placenta obtidas por método de punção venosa (preto sólido) seguido por método de perfusão de placenta por máquina (padrão de listras). Números arábicos abaixo de cada barra representam os números de amostras 20 representados na Tabela 3.

Figura 2, Percentagem de fração de células CD34+ via o método de PMPP continha percentagem aumentada em 4,9 vezes comparada àquela a partir da fração de punção venosa.

Figura 3. Contagem de células CD34+ a partir de fração de punção venosa e de fração de PMPP foi de $7,4 \times 10^6 \pm 5,9 \times 10^6$ (média \pm DP) (faixa de 8 pacientes, $1,1 - 18,2 \times 10^6$) e $28,8 \times 10^6 \pm 37 \times 10^6$ (média \pm DP) (faixa de $1,6 - 116 \times 10^6$), respectivamente, indicando que a fração de PMPP continha um aumento de 3,9 vezes em células CD34+ totais.

Figura 4. A percentagem média de células CD34+/CD38- em frações de punção venosa e de PMPP foi de $0,32 \pm 0,17\%$ (média \pm DP) (faixa de $0,04 - 0,66$) e $4,4 \pm 4,1\%$ (média \pm DP) (faixa de $1,3 - 14$), respectivamente, demonstrando que a fração de PMPP continha uma percentagem de população de células CD34+/CD38- aumentada em 13 - 14 vezes comparada à fração de punção venosa.

Figura 5. O número absoluto de células CD34+/CD38- em fração de punção venosa e de PMPP foi de $1,7 \pm 1,5 \times 10^6$ (média \pm DP) (faixa de $0,12 - 5,2$) e $17 \pm 22 \times 10^6$ (média \pm DP) (faixa de $0,86 - 65$), respectivamente (Figura 5), indicando que a fração de PMPP continha 10 vezes mais células CD34+/CD38-.

Figura 6. A percentagem de células CD133+ em fração de punção venosa e de PMPP foi de $0,55 \pm 0,8\%$ (média \pm DP) (faixa de $0 - 2,5$) e $2,4 \pm 2,0\%$ (média \pm DP) (faixa de $0,5$

- 6,8) respectivamente, demonstrando uma percentagem de células CD133+ enriquecidas em 4 vezes na fração de PMPP.

Figura 7.0 número de células CD133+ na fração de punção venosa e de PMPP foi de $0,98 \pm 0,8 \times 10^6$ (média \pm DP) (faixa de 0 - 2,3) e $6,3 \pm 0,8 \times 10^6$ (média \pm DP) (faixa de 0,55 - 11,2), respectivamente. A população de células CD133+ na fração de PMPP estava significativamente enriquecida em um nível 6,3 vezes mais elevado.

Figura 8A e 8B. A percentagem média e o número absoluto de células CD34+/CD38+ nas frações de punção venosa e de PMPP foi de $1,34 \pm 0,6\%$ (média \pm DP) (faixa de 0,26 - 2), $6,1 \pm 5,1 \times 10^6$ (média \pm DP) (faixa de 1,0 - 16,2) e $3,5 \pm 1,6\%$ (média \pm DP) (faixa de 0,82 - 6), $11,9 \pm 15 \times 10^6$ (média \pm DP) (faixa de 0,78 - 50), respectivamente, demonstrando um aumento de 2,6 vezes e de 1,95 vezes na percentagem de CD34+/CD38+ e do número absoluto, respectivamente, favorecendo PMPP.

Figura 9A e 9B. A percentagem média e o número absoluto de células CD133+/CD34- em frações de punção venosa e de perfusão de placenta por máquina pulsátil foi de $0,37 \pm 0,7\%$ (média \pm DP) (faixa de 0 - 2), $0,36 \pm 0,7 \times 10^6$ (média \pm DP) (faixa de 0 - 1,9) e $1,16 \pm 1,5\%$ (média \pm DP) (faixa de 0 - 5), $2,4 \pm 3,3 \times 10^6$ (média \pm DP) (faixa

de 0 - 9,9), respectivamente, indicando que a fração de PMPP continha CD133+/CD34- 3 vezes mais enriquecida e número de células CD133+/CD34- 6,6 vezes maior.

Figura 10A e 10B. A percentagem média e o número absoluto de células CD133+/CD34+ em frações de punção venosa e de perfusão de placenta por máquina pulsátil foi de $0,62 \pm 0,5\%$ (média \pm DP) (faixa de 0 - 0,6), $0,68 \pm 0,6 \times 10^6$ (média \pm DP) (faixa de 0 - 1,89) e $1,26 \pm 0,8\%$ (média \pm DP) (faixa de 0,35 - 2,9), $4,0 \pm 5,6 \times 10^8$ (média \pm DP) (faixa de 0,35 - 16,5), respectivamente, demonstrando que PMPP continha células CD133+/CD34+ 2 vezes mais enriquecidas e um número de células CD133+/CD34+ absoluto aumentado em 5,9 vezes.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Na seguinte descrição detalhada, os métodos da presente invenção podem ser realizados em inúmeras variações, e deve ser entendido que outras modalidades podem ser utilizadas e que mudanças lógicas podem ser feitas sem se desviar do escopo da presente invenção. A seguinte descrição detalhada, portanto, não deve ser tomada em um sentido limitante, e o escopo da presente invenção é definido pelas reivindicações apenas.

Embora inúmeras modalidades distintas sejam descritas abaixo, deve ser entendido que essas são meramente exemplos não limitantes, e que qualquer modalidade dada da invenção pode compreender algumas das características de uma
5 modalidade mostrada, e/ou algumas das características de outra modalidade mostrada.

Um método de coleta de células-tronco de sangue de cordão umbilical é descrito, o qual pode compreender ou consistir em perfusão, por exemplo, perfusão pulsátil, de
10 uma placenta de mamífero isolada não exsanguinada ou parcialmente exsanguinada com uma solução de perfusão, para produzir um perfusado compreendendo células-tronco de sangue de cordão umbilical; coleta do perfusado compreendendo células-tronco de sangue de cordão umbilical
15 e isolamento das células-tronco de sangue de cordão umbilical a partir do perfusado, para produzir células-tronco de sangue de cordão umbilical isoladas.

Além disso, é descrito um método, no qual o perfusado, por exemplo, resultando de perfusão pulsátil, mais
20 aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical, com um método de exsanguinação convencional, resulta em um aumento de pelo menos 1,5 vezes na contagem de células mononucleares totais obtidas a partir de uma placenta, comparado à aspiração de sangue de

cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical com uma agulha e seringa isoladamente.

É descrito outro método, no qual o perfusado, por exemplo, resultando de perfusão pulsátil, mais aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical, com um método de exsanguinação convencional, resulta em um aumento de pelo menos 2 vezes, um aumento maior do que 2 vezes a um aumento de 10 vezes, um aumento de 4 vezes a um aumento de 6 vezes ou aumento de 5,5 vezes na percentagem de células CD34+ obtidas, comparado à aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical com agulha e seringa isoladamente.

É descrito outro método, no qual o perfusado, por exemplo, resultando de perfusão pulsátil, mais aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical, com um método de exsanguinação convencional, resulta em um aumento de 4,9 vezes em células CD34+ totais obtidas, comparado à aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical com uma agulha e seringa isoladamente.

Também é descrito um método, no qual o perfusado, por exemplo, resultando de perfusão pulsátil, mais aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical, com um método de exsanguinação convencional,

resulta em aumento de pelo menos 5 vezes, um aumento mais que 5 vezes a um aumento de 20 vezes, um aumento de 12 vezes a um aumento de 18 vezes ou um aumento de 14,8 vezes da percentagem de população de células CD34+/CD38- obtidas, comparado à aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical com agulha e seringa isoladamente.

É descrito um método no qual o perfusado, por exemplo, resultando de perfusão pulsátil, mais aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical, com um método de exsanguinação convencional, resulta em pelo menos 5 vezes mais, 5 vezes a 20 vezes mais, 10 vezes a 15 vezes mais ou 11 vezes mais células CD34+/CD38- sendo coletadas, comparado à aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical com uma agulha e seringa isoladamente.

É descrito outro método, no qual o perfusado, por exemplo, resultando de perfusão pulsátil, mais aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical, com um método de exsanguinação convencional, resulta em um aumento de pelo menos 2 vezes, um aumento de 2 vezes a um aumento de 10 vezes, um aumento de 4 vezes a um aumento de 8 vezes ou um aumento de 5 vezes da percentagem de células CD133+ enriquecidas obtidas,

comparado à aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical com uma agulha e seringa isoladamente.

É descrito um método, no qual o perfusado, por exemplo, resultando de perfusão pulsátil, mais aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical, com um método de exsanguinação convencional, resulta em um aumento de pelo menos 3 vezes, um aumento de 3 vezes a um aumento de 15 vezes, um aumento de 5 vezes a um aumento de 19 vezes ou um aumento de 7 vezes mais elevado de população de células CD133+ obtida, comparado à aspiração de sangue de cordão umbilical a partir da vasculatura umbilical com uma agulha e seringa isoladamente.

15 I. Definições

As definições abaixo servem para fornecer um entendimento claro e consistente do relatório descritivo e das reivindicações, incluindo o escopo a ser dado a tais termos.

20 Perfusado - Os termos "perfusado" ou "perfusão" se referem ao ato de induzir um escoamento de um fluido sobre ou através de uma placenta não exsanguinada ou de uma placenta parcialmente exsanguinada, de preferência, a passagem de fluido através de uma placenta não exsanguinada

ou de uma placenta parcialmente exsanguinada com força ou pressão suficiente para remover quaisquer células residuais, por exemplo, células não fixadas, a partir do órgão ou do tecido. Conforme usado aqui, o termo

5 "perfusado" se refere ao fluido coletado seguindo a sua passagem através de um órgão ou tecido. Em uma modalidade preferida, o perfusado contém um ou mais anticoagulantes. Um escoamento de solução de perfusão pode compreender um escoamento de solução de perfusão mediado por pressão. Um

10 escoamento de solução mediado por pressão pode compreender um escoamento de solução mediado por pressão positiva ou negativa. Um escoamento de solução mediado por pressão pode compreender um escoamento de solução pulsátil.

A perfusão pode compreender a perfusão com pelo menos

15 um primeiro volume de solução de perfusão durante um período de tempo de desde cerca de 10 minutos a cerca de 1 hora; desde cerca de 15 minutos a cerca de 45 minutos ou desde cerca de 20 minutos a cerca de 30 minutos.

A perfusão pode compreender a perfusão de uma placenta

20 não exsanguinada ou de uma placenta parcialmente exsanguinada em um recipiente aberto ou fechado, rígido ou deformável. O recipiente pode compreender um volume de solução de perfusão tal que a placenta não exsanguinada ou uma placenta parcialmente exsanguinada isolada seja

submersa na solução de perfusão contida no recipiente durante a perfusão, por meio do quê o volume de solução de perfusão e a solução de perfusão contidos no recipiente sejam combinados antes de se isolar as células-tronco do sangue de cordão umbilical a partir dela. A placenta isolada submersa e a solução de perfusão circundante podem estar à pressão ambiente ou podem ser submetidas a uma pressão positiva e/ou negativa.

A perfusão pode compreender a submissão de uma placenta não exsanguinada ou uma placenta parcialmente exsanguinada a um escoamento pulsátil de solução de perfusão usando-se uma bomba pulsátil ou peristáltica, por exemplo, em desde cerca de 15 a cerca de 90 batimentos/minuto e em uma pressão sistólica de desde cerca de 15 a cerca de 90 mmHg; ou em cerca de 60 batimentos/minutos e em uma pressão sistólica de desde cerca de 30 a cerca de 70 mmHg.

A fonte de pressão usada para empurrar ou puxar a solução através da placenta da placenta de mamífero será suficiente para gerar um escoamento de solução a partir de um sistema pressurizado, por exemplo, uma bomba ou dispositivo peristáltico ou pulsátil. O uso de sistemas de bombeamento peristáltico facilita a retenção de esterilidade nas soluções sendo induzidas a escoar através

da placenta. O nível de pressão real ou taxa de bombeamento é ajustado para otimizar a remoção de sangue de cordão umbilical a partir de uma placenta parcialmente exsanguinada ou não exsanguinada.

5 Solução de perfusão. O termo "solução de perfusão" significa qualquer solução ou meio fisiologicamente compatível compreendendo um anticoagulante, suficiente para manter a viabilidade de células de cordão umbilical compreendendo células-tronco. Soluções de perfusão
10 adequadas podem compreender ou consistir em um meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute), opcionalmente compreendendo gliconato e/ou heparina, por exemplo, 1.000 U de heparina para um volume total de 1 litro; e Belzer MPS opcionalmente contendo heparina, por exemplo, 2.000 U de
15 heparina para um volume total de 600 - 750 mL. Outras soluções de perfusão adequadas são conhecidas e podem ser prontamente selecionadas e empregadas por um técnico especializado no assunto. A perfusão pode compreender a perfusão com pelo menos um primeiro volume de solução de
20 perfusão. A perfusão pode ser realizada em uma temperatura de desde cerca de 4°C a cerca de 27°C, por exemplo, à temperatura ambiente.

Primeiro volume - O termo "primeiro volume" significa um volume de uma solução de perfusão para perfundir uma

placenta de mamífero isolada não exsanguinada ou parcialmente exsanguinada. O primeiro volume da solução de perfusão pode compreender ou consistir desde cerca de 250 mL de solução de perfusão a cerca de 2 litros, desde cerca
5 de 400 mL a cerca de 1,5 litros; desde cerca de 500 mL a cerca de 1,2 litros, desde cerca de 600 mL a cerca de 1 litro e desde cerca de 600 mL a cerca de 750 mL de solução de perfusão.

Escoamento mediado por pressão - O termo "escoamento
10 mediado por pressão" significa um escoamento de solução de perfusão induzido por pressão positiva ou negativa.

Pressão negativa - O termo "pressão negativa" significa uma pressão abaixo da pressão atmosférica, isto é, menor do que uma atmosfera.

15 Pressão positiva - O termo "pressão positiva" significa uma pressão igual ou acima de uma atmosfera, isto é, maior ou igual a uma atmosfera.

Placenta exsanguinada - O termo "placenta exsanguinada" significa uma placenta isolada a partir da
20 qual todo o sangue circulante tenha sido removido ou retirado, isto é, para tornar livre de sangue.

Não exsanguinada - O termo "placenta não exsanguinada" significa uma placenta isolada, a partir da qual nenhum sangue circulante tenha sido removido ou retirado.

Parcialmente exsanguinada - O termo "placenta parcialmente exsanguinada" significa uma placenta isolada, a partir da qual uma porção da sangue circulante tenha sido removido ou retirado.

5 Célula-tronco - Conforme usado aqui, o termo "célula-tronco" se refere a uma célula mestra que possa se reproduzir indefinidamente para formar as células especializadas de tecidos e órgãos. Uma célula-tronco é uma célula que se desenvolve de maneira pluripotente ou
10 multipotente. Uma célula-tronco pode se dividir para produzir duas células-tronco filhas, ou uma célula-tronco filha e uma célula progenitora ("de trânsito"), que então, se prolifera em células de tecido maduras, completamente formadas. A "célula-tronco" usada aqui inclui "células
15 progenitoras", a menos se afirmado de outra maneira.

Células-tronco hematopoiéticas são progenitores de células do sangue primitivas raras, que possuem a capacidade de se auto-replicar, de modo a manter uma fonte contínua de células regenerativas, e de se diferenciarem,
20 de modo a dar origem a vários precursores morfológicamente reconhecíveis de linhagens de células do sangue. Esses precursores são células do sangue imaturas, que não podem se auto-replicar e têm que se diferenciar em células do sangue maduras, incluindo as células eritróides, linfóides

e mielóides. Dentro do microambiente de medula óssea, as células-tronco se auto-proliferam e mantêm, de maneira ativa, a produção contínua de todas as linhagens de células do sangue durante toda a vida.

5 Células CD34+ são definidas como a mais precoce célula-tronco hematopoiética identificável na medula óssea, no sangue periférico ou no sangue de cordão umbilical neonatal. O suplemento e o meio da presente invenção são particularmente adequados para suportar a expansão de
10 células CD34+ e células de linhagem mielóide, incluindo células BFU-E, eritrócitos, células CFU-MEG, megacariócitos, células CFU-GM, monócitos, macrófagos, neutrófilos eosinófilos e basófilos. Em estágios mais precoces de desenvolvimento, células de linhagem mielóide
15 expressam a proteína marcadora CD34+. Em estágios tardios de desenvolvimento, células de linhagem mielóide não expressam níveis detectáveis da proteína marcadora CD34+.

Se uma célula-tronco do sangue de cordão umbilical expressa a proteína marcadora CD34+, isso pode ser
20 determinado por um técnico especializado no assunto, usando técnicas bem conhecidas, tais como classificação de células ativadas por fluorescência.

"Células hematopoiéticas CD34+" ou "células CD34+" são células hematopoiéticas, que expressam a proteína marcadora

de superfície CD34+. Tais células incluem, mas, não estão limitadas a células-tronco hematopoiéticas, células mielóides progenitoras ou precursoras, células eritróides progenitoras ou precursoras e células linfóides progenitoras ou precursoras.

Células CD34+ podem ser isoladas a partir do sangue de cordão umbilical coletado e/ou perfusado, para produzir células-tronco de sangue de cordão umbilical isoladas usando métodos que são bem conhecidos pelos técnicos especializados no assunto. Vários sistemas estão disponíveis aos técnicos especializados no assunto. Por exemplo, o MicroCELLector System. RTM. (Applied Immune Sciences), o MiniMacs System (Miltenvi Biotec), o StemSep.TM. system (StemCell Technologies) podem ser usados para isolar células CD34+. Para obter uma preparação de células enriquecida de células CD34+ em larga escala, os sistemas comercializados por Baxter Healthcare e CellPro estão disponíveis aos técnicos especializados no assunto.

Os termos "célula-tronco hematopoiética" e "célula-tronco hematopoiética pluripotente" se referem a uma célula, que pode dar origem a qualquer tipo de células progenitora ou precursora hematopoiética, incluindo células mielóides progenitoras ou precursoras, células eritróides progenitoras ou precursoras e células linfóides

progenitoras ou precursoras. Células-tronco hematopoiéticas exibem um fenótipo CD34+ /CD33- /CD38- ou um fenótipo CD34+ /HLD-DR.- /CD38- (Daley, J. P. et al., Focus 18:62-67 (1996); Pimentel, E., Ed., Handbook of Growth Factors Vol. III: Hematopoietic Growth Factors and Cytokines, págs. 1-2, CRC Press, Boca Raton, Fla., 1994).

1. Método de coleta de células CB de placenta com ou sem coleta de CB convencional prévia

Uma prova de teste piloto conceitual para um método de coleta de CB usando tecnologia de perfusão pulsátil com o uso do dispositivo de perfusão pulsátil RM3 de Waters (Waters Medical Systems, Rochester, MN) amplamente usada para preservação renal foi bem sucedida. O dispositivo foi originalmente projetado para melhorar a função imediata dos rins, que são armazenados antes do transplante. A solução de perfusão consistia de meios de RPMI (Roswell Park Memorial Institute) com gliconato e 1.000 U de heparina para um total de 1 litro ou Belzer MPS mais 1.000 - 2.000 U de heparina (600 - 750 mL de Belzer MPS com 2.000 U de heparina sódica). Atualmente, demonstrou-se usando uma placenta de babuíno, a factibilidade desse método e perfusão bem sucedida e remoção de todas as CB de placenta restantes. A coleta de uma contagem de células mononucleares total absoluta, contagem de células

formadoras de colônias (CFC), percentagem de CD34+ e CD34+/CD38- e a contagem foi de aproximadamente 2 vezes maior, quando a perfusão por máquina foi adicionada ao método de punção venosa convencional comparado ao método de punção venosa isoladamente.

Com base na coleta de CB de babuíno promissora por perfusão por máquina pulsátil, esse método foi testado em placentas humanas. Coleções de oito CB foram realizadas em placentas de 36 - 41 semanas a partir de sete partos vaginais normais e uma seção cesariana sob o protocolo clínico aprovado pelo Comitê de Revisão de Institucional da Universidade de Maryland. A coleção de CB parcial foi primeiramente feita por punção venosa com agulha / seringa, para aspirar a máxima quantidade possível, tão logo o cordão umbilical fosse pinçado e o bebê fosse parido, enquanto a placenta ainda estivesse no útero. Esse método é usado tanto para seção trans-vaginal quanto para a seção cesariana para maximizar o rendimento de coleta de CB e é um dos vários métodos usados amplamente para coleta de CB de rotina. A agulha de calibre 18 foi fixada a seringas de 30 ou 60 mL e o material de CB aspirado foi imediatamente transferido para um tubo cônico de 50 mL contendo 5.000 U de heparina sódica. A CB coletada foi imediatamente misturada com heparina, para evitar a coagulação e

armazenada em um banho de gelo. O volume de CB médio coletado por esse procedimento foi de 59 ± 18 mL (média \pm DP) (faixa de 40 - 90 mL). A seguir, a placenta foi parida de modo rotineiro e colocada diretamente em uma bolsa de isolamento estéril (3M Health Care St. Paul, MN). Se a placenta exigiu exame visual, ela foi colocada em uma bandeja estéril e transferida para uma bolsa de isolamento estéril no momento de se completar o exame. A placenta foi também pesada dentro da bolsa estéril. A bolsa estéril foi rigidamente fechada, colocada em isolamento de bolsa triplo e mantida em um banho de gelo sem qualquer manipulação até que a perfusão de placenta foi iniciada. As placentas foram perfundidas entre 6,25 e 39 horas depois do parto. Uma placenta pode ser resfriada depois do isolamento em uma temperatura de desde cerca de -3°C a cerca de 15°C , desde cerca de -8°C a cerca de 10°C , desde cerca de -2°C a cerca de 6°C ou desde cerca de 0°C a cerca de 6°C , contanto que não se permita que a placenta congele. A placenta resfriada pode ser mantida, antes da perfusão, em uma temperatura abaixo do congelamento, por exemplo, em desde cerca de $>0^{\circ}\text{C}$ a cerca de 15°C , em cerca de $>0^{\circ}\text{C}$ a cerca de 10°C ou em cerca de 2°C a cerca de 6°C , durante um período de tempo de desde cerca de 30 minutos a cerca de 60 horas, desde cerca de 1 hora a cerca de 50 minutos; desde cerca de 6 horas a

cerca de 40 horas; desde cerca de 10 horas a cerca de 40 horas; desde cerca de 15 horas a cerca de 40 horas; ou desde cerca de 20 horas a cerca de 40 horas.

Para realizar a perfusão da placenta por máquina pulsátil (PMPP), a placenta foi colocada em um campo estéril e examinada para determinar se houve quaisquer lacerações ou rasgamentos na mesma. Então, o cordão umbilical foi examinado para procurar duas artérias umbilicais e uma veia de cordão umbilical. Uma ou mais das duas artérias umbilicais e a veia umbilical foram cateterizadas para facilitar a perfusão. Primeiro, um catéter reto de 6 mm foi inserido em uma veia de cordão umbilical e fixado no lugar com uma amarração feita de seda e revestida com óleo, então, ambas as artérias foram, cada uma, penetradas com catéteres retos de 2 mm e fixados no lugar com amarrações de seda revestida com óleo. A placenta foi colocada no circuito de perfusão (bomba de perfusão de rim Waters RM3), que foi iniciada com Belzer MPS mais 1.000 - 2.000 U de heparina (600 - 750 mL de Belzer MPS com 2.000 U de heparina sódica), em uma temperatura de 1°C a 27°C. Belzer MPS é um perfusado de órgão aprovado pela FDA usado para a preservação de órgãos doados a partir de cadáveres para transplante (Gage *et al.*, 1997). Perfusão por máquina pulsátil foi realizada em 60 batimentos/minuto e a pressão

sistólica estava entre 30 - 70 mmHg. O tempo médio para completar a perfusão foi de 26 minutos (faixa de 20 - 30 minutos). Para se determinar se a perfusão da placenta era completa, os inventores usaram a mudança de cor do tecido da placenta, de uma cor azul escuro para uma cor branca clara como um marcador indicando uma total evacuação do conteúdo vascular na placenta.

Oito amostras de CB foram coletadas usando-se punção venosa e método de perfusão de placenta por máquina pulsátil a partir do mesmo indivíduo e suas descrições quantitativas estão resumidas na Tabela 1. O volume de CB médio coletado por punção venosa foi conforme descrito acima. O volume médio de CB a partir do método de perfusão de placenta por máquina pulsátil não foi mensurável, uma vez que o perfusado e o CB foram misturados no final. A gestação média da placenta coletada foi de 38,6 semanas (faixa de 36 - 41 semanas) e o tamanho médio de placenta para diâmetro e espessura foi de 20 x 1 cm (17 - 22 x 1 cm). As placentas foram obtidas a partir de seção cesariana (amostra 1) e de 7 partos vaginais (amostras 2 - 8). O tempo médio a partir do parto da placenta até o início da perfusão foi de 17 horas (6,25 - 39 horas), e a duração de tempo do procedimento de perfusão da placenta foi de menos do que 30 minutos por placenta (média de 26 minutos, faixa

de 20 - 30 minutos) (Tabela 1). Foi constatada trombose em 3 placentas (amostras 3, 5 e 6) e foi de aproximadamente 5%, 10% e 7% da área total de placenta, mas, não constatada em outros sujeitos. Essas placentas foram empacotadas em gelo a uma temperatura de 4°C, em banho termicamente isolado entre 19 e 39 horas, até o início da perfusão. Em geral, não houve dificuldade na realização de perfusão por máquina para cada placenta que foi testada, incluindo aquelas com trombose e nenhum barotrauma foi observado devido à perfusão por máquina pulsátil.

2. Análise de solução coletada a partir de PMPP em comparação com método de colheita de sangue de cordão umbilical convencional

Isolamento de células mononucleares CB

Células CB obtidas a partir de punção venosa da vasculatura da placenta foram primeiro diluídas com meio Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) em 1:5 e células mononucleares foram isoladas por centrifugação por gradiente de densidade em Ficoll-Hypaque (Sigma Diagnostic, St. Louis, MO), conforme previamente descrito (Takebe et al., 2002). A camada contendo células mononucleares foi cuidadosamente aspirada, as células foram lavadas duas vezes com solução de PBS e enumeradas por citometria. A viabilidade celular foi confirmada por método de exclusão

com Azul de Tripano. Células CB obtidas via PMPP foram processadas similarmente às células CB a partir de punção venosa. Entretanto, essas células foram misturadas em um grande volume de perfusado (650 a 800 mL e volume total).
5 Esse perfusado foi amostrado por alíquota dentre várias dúzias ou tal de tubos cônicos de 50 mL, os quais foram centrifugados em conjunto, à 1.800 rpm, durante 20 minutos, para se obter a camada de células brancas. Então, as células foram ulteriormente separadas para células
10 mononucleares com centrifugação por gradiente de densidade em Ficoll-Hypaque. Células CB foram lavadas e enumeradas como descrito acima.

Análise por citometria por escoamento

Células mononucleares foram tingidas com anticorpos
15 monoclonais incluindo CD38- FITC anti-humano , CD34-APC (BD Pharmingen, San Jose, CA), AC133-PE (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) e analisadas por Facstar-plus (Becton Dickinson) de acordo com as instruções do fabricante. Controles com isótopos foram realizados usando-se
20 anticorpos apropriados, em paralelo, para cada amostra.

Seleção de células CD34+

A alíquota de células mononucleares CB obtida a partir de centrifugação por gradiente de densidade em Ficoll-Hypaque foi ulteriormente isolada para enriquecer a

população de células CD34+ por método de separação magnética de células usando o Kit de Isolamento de Células progenitoras CD34 (Miltenyi Biotec) de acordo com as instruções do fabricante. O número de células purificadas e a viabilidade foram determinadas por citometria e teste de exclusão com Azul de Tripano. O enriquecimento de células CD34+ foi confirmado por análise por citometria por escoamento, e cada lote de isolamento exibiu pureza de células CD34+ maior do que 90%, com viabilidade acima de 95% por método de exclusão com Azul de Tripano.

Ensaio de unidade formadora de colônias em metilcelulose

Células CD34+ CB purificadas (3×10^3 por placa) foram semeadas em placas de cultura de 35 mm conforme descrito previamente (Takebe *et al.*, 2002). As células foram cultivadas nos meios de cultura comercialmente disponível, MethoCult (StemCell Technology, Vancouver, Canadá), que consistiam em 1 mL de IMDM, metilcelulose à 1%, BSA, 2-mercaptoetanol, L-glutamina, insulina, transferrina, SGF, GM-CSF, IL-3, IL-6, G-CSF e eritropoietina de acordo com as instruções do fabricante. No dia 14, as colônias (maiores do que 50 células) foram enumeradas a partir de placas de cultura duplicadas.

REFERÊNCIAS

As seguintes referências são aqui incorporadas por referência, em sua totalidade.

- ALMEIDA-PORADA, G., PORADA, C.D., CHAMBERLAIN, J., TORABI, A., e ZANJANI, E. D. (2004). Formation of human hepatocytes by human hematopoietic stem cells in sheep. *Blood* 104, 2582-2590.
- AZIZI, S.A., STOKES, D., AUGELLI, B.J., DIGIROLAMO, C., e PROCKOP, D.J. (1998). Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3908-3913.
- BARKER, J.N., KREPSKI, T.P., DEFOR, T.E., DAVIES, S.M., WAGNER, J.E., e WEISDORF, D.J. (2002). Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biol Blood Marrow Transplant* 8, 257-260.
- BELVEDERE, O., FERUGLIO, C., MALANGONE, W., BONORA, M.L., MINISINI, A.M., SPIZZO, R., DONINI, A., SALA, P., DE ANNA, D., HILBERT, D.M., e DEGRASSI, A. (2000). Increased blood volume and CD34(+)CD38(-) progenitor cell recovery using a novel umbilical cord blood collection system. *Stem Cells* 18, 245-251.

- BERTOLINI, F., LAZZARI, L., LAURI, E., CORSINI, C.,
CASTELLI, C., GORINI, F., e SIRCHIA, G. (1995).
Comparative study of different procedures for the
collection and banking of umbilical cord blood. J
5 Hematother 4, 29-36.
- BHATTACHARYA, S., JACKSON, J.D., DAS, A.V., THORESON, W.B.,
KUSZYNSKI, C., JAMES, J., JOSHI, S., e AHMAD, I.
(2003). Direct identification and enrichment of
retinal stem cells/progenitors by Hoechst dye
10 efflux assay. Invest Ophthalmol Vis Sci 44, 2764-
2773.
- BICKNESE, A.R., GOODWIN, H.S., QUINN, C.O., HENDERSON,
V.C., CHIEN, S.N., e WALL, D.A. (2002). Human
umbilical cord blood cells can be induced to
15 express markers for neurons and glia. Cell
Transplant 11 , 261-264.
- BRAZELTON, T.R., ROSSI, F.M., KESHET, G.I, e BLAU, H.M.
(2000). From marrow to brain: expression of
neuronal phenotypes in adult mice. Science 290,
20 1775-1779.
- CAI, J., CHENG, A., LUO, Y., LU, C, MATTSON, M.P., RAO,
M.S., e FURUKAWA, K. (2004a). Membrane properties
of rat embryonic multipotent neural stem cells. J
Neurochem 88, 212-226.

- CAI, J., WEISS, M.L., e RAO, M.S. (2004b). In search of "sternness". *Exp Hematol* 32, 585-598.
- CAI, J., WU, Y., MIRUA. T., PIERCE, J.L., LUCERO, M.T., ALBERTINE, K.H., SPANGRUDE, G.J., e RAO, M.S. (2002). Properties of a fetal multipotent neural stem cell (NEP cell). *Dev Biol* 251, 221-240.
- CAMARGO, F.D., FINEGOLD, M., and GOODELL, M.A. (2004). Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners. *J Clin Invest* 113, 1266-1270.
- CHEN, N., HUDSON, J.E., WALCZAK, P., MISIUTA, I., GARBUZOVA-DAVIS, S., JIANG, L., SANCHEZ-RAMOS, J., SANBERG, P.R., ZIGOVA, T., e WILLING, A.E. (2005). Human Umbilical Cord Blood Progenitors: The Potential of These Hematopoietic Cells to Become Neural. *Stem cells* (Dayton, Ohio).
- COGLE, C.R., YACHNIS, A.T., LAYWELL, E.D., ZANDER, D.S., WINGARD, J.R., STEINDLER, D.A., e SCOTT, E.W. (2004). Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. *Lancet* 363, 1432-1437.
- CORTI, S., LOCATELLI, F., PAPADIMITRIOU, D., DONADONI, C., DEL BO, R., CRIMI, M., BORDONI, A., FORTUNATO, F., STRAZZER, S., MENOZZI, G., SALANI, S., BRESOLINI,

- N., e COMI, G.P. (2006). Transplanted ALDHhiSSCio neural stem cells generate motor neurons and delay disease progression of nmd mice, an animal model of SMARD1. *Hum Mol Genet* 15, 167-187.
- 5 DONALDSON, C., ARMITAGE, W.J., LAUNDY, V., BARRON, C., BUCHANAN, R., WEBSTER, J., BRADLEY, B., e HOWS, J. (1999). Impact of obstetric factors on cord blood donation for transplantation. *British journal of haematology* 106, 128-132.
- 10 EGLITIS, M.A., e MEZEY, E. (1997). Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4080-4085.
- ESCOLAR, M.L., POE, M.D., PROVENZALE, J.M., RICHARDS, K.C.,
15 ALLISON, J., WOOD, S., WENGER, D.A., PIETRYGA, D., WALL, D., CHAMPAGNE, M., MORSE, R., KRIVIT, W., e KURTZBERG, J. (2005). Transplantation of umbilical-cord blood in babies with infantile Krabbe's disease. *N Engl J Med* 352, 2069-2081.
- 20 FERRARI, G., CUSELLA-DE ANGELIS, G., COLETTA, M., PAOLUCCI, E., STORNAIUOLO, A., COSSU, G., e MAVILIO, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528-1530.

- FORRAZ, N., PETTENGELL, R., e MCGUCKIN, C.P. (2004).
Characterization of a lineage-negative stem-
progenitor cell population optimized for ex vivo
expansion and enriched for LTC-IC. Stem cells
5 (Dayton, Ohio) 22, 100-108.
- FORTUNEL, N.O., OTU, H.H., NG, H.H., CHEN, J., MU, X.,
CHEVASSUT, T., LI, X., JOSEPH, M., BAILEY, C.,
HATZFELD, J.A., HATZFELD, A., USTA, F., VEGA, V.B.,
LONG, P.M., LIBERMANN, T.A., e LIM, B. (2003).
10 Comment on "'Sternness': transcriptional profiling
of embryonic and adult stem cells" and "a stem cell
molecular signature". Science 302, 393; resposta do
autor 393.
- GAGE, F., BARHYTE, D.Y., KOWALSKI, A.E., LIGHT, J.A.,
15 WILMER, R., e CALLENDER, C.O. (1997). A comparison
study of the Belzer machine preservation solution
with and without penicillin. Transplant Proc 29,
3643.
- GEKAS, C., DIETERLEN-LIEVRE, F., ORKIN, S.H., e MIKKOLA,
20 H.K. (2005). The placenta is a niche for
hematopoietic stem cells. Dev Cell 8, 365-375.
- GEORGE, T.J., SUGRUE, M.W., GEORGE, S.N., e WINGARD, J.R.
(2006). Factors associated with parameters of

engraftment potential of umbilical cord blood.
Transfusion 46, 1803-1812.

5 GLUCKMAN, E., ROCHA, V., BOYER-CHAMMARD, A., LOCATELLI, F.,
ARCESE, W., PASQUINI, R., ORTEGA, J., SOUILLET, G.,
FERREIRA, E., LAPORTE, J.P., FERNANDEZ, M., e
CHASTANG, C. (1997). Outcome of cord-blood
transplantation from related and unrelated donors.
Eurocord Transplant Group and the European Blood
and Marrow Transplantation Group. N Engl J Med 337,
10 373-381.

GOODWIN, H.S., BICKNESE, A.R., CHIEN, S.N., BOGUCKI, B.D.,
QUINN, C.O., e WALL, D.A. (2001). Multilineage
differentiation activity by cells isolated from
umbilical cord blood: expression of bone, fat, and
15 neural markers. Biol Blood Marrow Transplant 7,
581-588.

HARRIS, D.T., SCHUMACHER, M.J., RYCHLIK, S., BOOTH, A.,
ACEVEDO, A., RUBINSTEIN, P., BARD, J., e BOYSE,
E.A. (1994). Collection, separation and
20 cryopreservation of umbilical cord blood for use in
transplantation. Bone marrow transplantation 13,
135-143.

HRUBAN, R.H., LONG, P.P., PERLMAN, E.J., HUTCHINS, G.M.,
BAUMGARTNER, W.A., BAUGHMAN, K.L., e GRIFFIN, C.A.

(1993). Fluorescence in situ hybridization for the Y-chromosome can be used to detect cells of recipient origin in allografted hearts following cardiac transplantation. *Am J Pathol* 142, 975-980.

5 KIM, M., TURNQUIST, H., JACKSON, J., SGAGIAS, M., YAN, Y.,
GONG, M., DEAN, M., SHARP, J.G., e COWAN, K.
(2002). The multidrug resistance transporter ABCG2
(breast cancer resistance protein 1) effluxes
Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic
10 stem cells. *CIJn Cancer Res* 8, 22-28.

KORBLING, M., KATZ, R.L, KHANNA, A., RUIFROK, A.C., RONDON,
G., ALBITAR, M., CHAMPLIN, R.E., e ESTROV, Z.
(2002). Hepatocytes and epithelial cells of donor
origin in recipients of peripheral-blood stem
15 cells. *N Engl J Med* 346, 738-746.

KUCI, S., WESSELS, J.T., BUHRING, H.J., SCHILBACH, K.,
SCHUMM, M., SEITZ, G., LOFFLER, J., BADER, P.,
SCHLEGEL, P.G., NIETHAMMER, D., e HANDGRETINGER, R.
(2003). Identification of a novel class of human
20 adherent CD34- stem cells that give rise to SCID-
repopulating cells. *Blood* 101, 869-876.

KUCIA, M., HALASA, M., WYSOCZYNSKI, M., BASKIEWICZ-MASIUK,
M., MOLDENHAWER, S., ZUBA-SURMA, E., CZAJKA, R.,
WOJAKOWSKI, W., MACHALINSKI, B., e RATAJCZAK, M.Z.

(2006). Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4(+) SSEA-4(+) Oct-4(+) very small embryonic-like cells purified from human cord blood - preliminary report. *Leukemia*.

5

KURTZBERG, J., LAUGHLIN, M., GRAHAM, M.L., SMITH, C., OLSON, J.F., HALPERIN, E.C., CIOCCI, G., CARRIER, C., STEVENS, C.E., e RUBINSTEIN, P. (1996). Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* 335, 157-166.

10

LAGASSE, E., CONNORS, H., AL-DHALIMY, M., REITSMA, M., DOHSE, M., OSBORNE, L, WANG, X., FINEGOLD, M., WEISSMAN, I.L., e GROMPE, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6, 1229-1234.

15

LASKY, L.C., LANE, T.A., MILLER, J.P., LINDGREN, B., PATTERSON, H.A., HALEY, N.R., e BALLEEN, K. (2002). In utero or ex utero cord blood collection: which is better? *Transfusion* 42, 1261-1267.

20

LAUGHLIN, M.J., EAPEN, M., RUBINSTEIN, P., WAGNER, J.E., ZHANG, M.J., CHAMPLIN, R.E., STEVENS, C., BARKER, J.N., GALE. R.P., LAZARUS, H.M., MARKS, D.I., VAN ROOD, J.J., SCARADAVOU, A., e HOROWITZ, M.M.

(2004). Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med* 351 , 2265-2275.

LEESER, D.B., BINGAMAN, A.W., POLIAKOVA, L., SHI, Q., GAGE, F., BARTLETT, ST., e FARNEY, A.C. (2004). Pulsatile pump perfusion of pancreata before human islet cell isolation. *Transplant Proc* 36, 1050-1051.

MCGUCKIN, C.P., FORRAZ, N., ALLOUARD, Q., e PETTENGELL, R. (2004). Umbilical cord blood stem cells can expand hematopoietic and neuroglial progenitors in vitro. *Exp Cell Res* 295, 350-359.

MCGUCKIN, C.P., FORRAZ, N., BARADEZ, M.O., NAVRAN, S., ZHAO, J., URBAN, R., TILTON, R., e DENNER, L. (2005). Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif* 38, 245-255.

MEZEY, E., CHANDROSS, K.J., HARTA, G., MAKI, R.A., e MCKERCHER, S.R. (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290, 1779-1782.

MIGISHIMA, F., OIKAWA, A., KONDO, S., EMA, H., MORITA, Y., NAKAUCHI, H., YOKOYAMA, M., SONG, S.Y., NISHIJIMA, M., OKABE, M., e SHINOHARA, N. (2003). Full reconstitution of hematopoietic system by murine

umbilical cord blood. Transplantation 75, 1820-1826.

MULLER, P., PFEIFFER, P., KOGLIN, J., SCHAFERS, H.J., SEELAND, U., JANZEN, I., URBSCHAT, S., e BOHM, M. (2002). Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts. Circulation 106, 31-35.

OKAMOTO, R., YAJIMA, T., YAMAZAKI, M., KANAI, T., MUKAI, M., OKAMOTO, S., IKEDA, Y., HIBI, T., INAZAWA, J., e WATANABE, M. (2002). Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. Nat Med 8, 1011-1017.

OTTERSBACH, K., e DZIERZAK, E. (2005). The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. Dev Cell 8, 377-387.

PARMAR, K., SAUK-SCHUBERT, C., BURDICK, D., HANDLEY, M., e MAUCH, P. (2003). Sca+CD34- murine side population cells are highly enriched for primitive stem cells. Exp Hematol 31, 244-250.

PETERSEN, B.E., BOWEN, W.C., PATRENE, K.D., MARS, W.M., SULLIVAN, A.K., MURASE, N., BOGGS, S.S., GREENBERGER, J.S., e GOFF, J.P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. Science 284, 1168-1170.

- QUAINI, F., URBANEK, K., BELTRAMI, A.P., FINATO, N.,
BELTRAMI, C.A., NADAL-GINARD, B., KAJSTURA, J.,
LERI, A., e ANVERSA, P. (2002). Chimerism of the
transplanted heart. *N Engl J Med* 346, 5-15.
- 5 RUBINSTEIN, P., CARRIER, C., SCARADAVOU, A., KURTZBERG, J.,
ADAMSON, J., MIGLIACCIO, A.R., BERKOWITZ, R.L.,
CABBAD, M., DOBRILA, N.L, TAYLOR, P.E., ROSENFELD,
R.E., e STEVENS, CE. (1998). Outcomes among 562
recipients of placental-blood transplants from
10 unrelated donors. *N Engl J Med* 339, 1565-1577.
- RUBINSTEIN, P., ROSENFELD, R.E., ADAMSON, J.W., e STEVENS,
C.E., (1993). Stored placental blood for unrelated
bone marrow reconstitution. *Blood* 81 , 1679-1690.
- SANCHEZ-RAMOS, J., SONG, S., CARDOZO-PELAEZ, F., HAZZI, C.,
15 STEDEFORD, T., WILLING, A., FREEMAN, T.B., SAPORTA,
S., JANSSEN, W., PATEL, N., COOPER, D.R., e
SANBERG, P.R. (2000). Adult bone marrow stromal
cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp*
Neurol 164, 247-256.
- 20 SANCHEZ-RAMOS, J.R. (2002). Neural cells derived from adult
bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci*
Res 69, 880-893.
- SANCHEZ-RAMOS, J.R., SONG, S., KAMATH, S.G., ZIGOVA, T.,
WILLING, A., CARDOZO-PELAEZ, F., STEDEFORD, T.,

CHOPP, M., e SANBERG, P.R. (2001). Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol* 171, 109-115.

SCHARENBERG, C.W., HARKEY, M.A., e TOROK-STORB, B. (2002).

5 The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 99, 507-512.

SHLEBAK, A.A., ROBERTS, I.A., STEVENS, T.A., SYZDLO, R.M.,

10 GOLDMAN, J.M., e GORDON, M.Y. (1998). The impact of antenatal and perinatal variables on cord blood haemopoietic stem/progenitor cell yield available for transplantation. *Br J Haematol* 103, 1167-1171.

STORMS, R.W., TRUJILLO, A.P., SPRINGER, J.B., SHAH, L,

15 COLVIN, O.M., LUDEMAN, S.M., e SMITH, C. (1999). Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9118-9123.

TAKEBE, N., XU, L.C., MACKENZIE, K.L., BERTINO, J.R., e

20 MOORE, M.A., (2002). Methotrexate selection of long-term culture initiating cells following transduction of CD34(+) cells with a retrovirus containing a mutated human dihydrofolate reductase gene. *Cancer Gene Ther* 9, 308-320.

- TAKEBE, N., ZHAO, S.C., ADHIKARI, D., MINEISHI, S.,
SADELAIN, M., HILTON, J., COLVIN, M., BANERJEE, D.,
e BERTINO, J.R. (2001). Generation of dual
resistance to 4-hydroperoxycyclophosphamide and
5 methotrexate by retroviral transfer of the human
aldehyde dehydrogenase class 1 gene and a mutated
dihydrofolate reductase gene. *Mol Ther* 3, 88-96.
- THEISE, N.D., NIMMAKAYALU, M., GARDNER, R., ILLEI, P.B.,
MORGAN, G., .TEPERMAN, L., HENEGARIU, O., e KRAUSE,
10 D.S. (2000). Liver from bone marrow in humans.
Hepatology 32, 11-16.
- TURNER, C.W., LUZINS, J., e HUTCHESON, C. (1992). A
modified harvest technique for cord blood
hematopoietic stem cells. *Bone marrow*
15 *transplantation* 10, 89-91.
- WAGNER, J.E., BARKER, J.N., DEFOR, T.E., BAKER, K.S.,
BLAZAR, B.R., EIDE, C., GOLDMAN, A., KERSEY, J.,
KRIVIT, W., MACMILLAN, M.L., ORCHARD, P.J., PETERS,
C, WEISDORF, D.J., RAMSAY, N.K., e DAVIES, S.M.
20 (2002). Transplantation of unrelated donor
umbilical cord blood in 102 patients with malignant
and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell
dose and HLA disparity on treatment-related
mortality and survival. *Blood* 100, 1611-1618.

- WAGNER, J.E., BROXMEYER, H.E., e COOPER, S. (1992).
Umbilical cord and placental blood hematopoietic
stem cells: collection, cryopreservation, and
storage. J Hematother 1, 167-173.
- 5 WAGNER, J.E., ROSENTHAL, J., SWEETMAN, R., SHU, X.O.,
DAVIES, S.M., RAMSAY, N.K., MCGLAVE, P.B., SENDER,
L., e CAIRO, M.S. (1996). Successful
transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched
umbilical cord blood from unrelated donors:
10 analysis of engraftment and acute graft-versus-host
disease. Blood 88, 795-802.
- WANG, X., GE, S., MCNAMARA, G., HAO, Q.L, CROOKS, G.M., e
NOLTA, J.A. (2003a). Albumin-expressing hepatocyte-
like cells develop in the livers of immune-
15 deficient mice that received transplants of highly
purified human hematopoietic stem cells. Blood 101,
4201-4208.
- WANG, X., WILLENBRING, H., AKKARI, Y., TORIMARU, Y.,
FOSTER, M., AL-DHALIMY, M., LAGASSE, E., FINEGOLD,
20 M., OLSON, S., e GROMPE, M. (2003b). Cell fusion is
the principal source of bone-marrow-derived
hepatocytes. Nature 422, 897-901.
- ZHOU, S., SCHUETZ, J.D., BUNTING, K.D., COLAPIETRO, A.M.,
SAMPATH, J., MORRIS, J.J., LAGUTINA, I., GROSVELD,

G.C., OSAWA, M., NAKAUCHI, H., e SORRENTINO, B.P.
(2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is
expressed in a wide variety of stem cells and is a
molecular determinant of the side-population
5 phenotype. Nat Med 7, 1028-1034.

ZIGOVA, T., SONG, S., WILLING, A.E., HUDSON, J.E., NEWMAN,
M. B., SAPORTA, S., SANCHEZ-RAMOS, J., e SANBERG,
P.R. (2002). Human umbilical cord blood cells
express neural antigens after transplantation into
10 the developing rat brain. Cell Transplant 11, 265-
274.

Tendo descrito a invenção em detalhes e por referência
às suas modalidades, será evidente que modificações e
variações são possíveis, incluindo a adição de elementos ou
15 o rearranjo ou combinação ou um ou mais elementos, sem se
desviar do escopo da invenção, que é definida nas
reivindicações apenas. Portanto, a presente invenção não
pretende estar limitada às modalidades mostradas aqui, mas,
deve ser considerada com o mais amplo escopo consistente
20 com os princípios e características novas aqui revelados.

Tabela 1. Características de coleções de sangue de cordão umbilical a partir de 8 placentas

Amostra nº	Gestação (semanas)	Tamanho de placenta (diâmetro x espessura cm)	Tempo até perfusão (horas)	Tempo de perfusão (horas)	Volume de CB por seringa (mL)	Método de parto	Coagulação de sangue na placenta (%)
1	39	18 x 1	9,5	0,5	50	cesariana	0
2	39	19 x 1	7	0,5	80	normal	0
3	39	22 x 1	27	0,42	65	normal	5
4	40	21 x 1	15	0,37	62	normal	0
5	36	18 x 1	39	0,33	40	normal	10
6	40	25 x 1	19	0,42	90	normal	7
7	36	17 x 1	6,25	0,33	46	normal	0
8	40	21 x 1	12,5	0,6	49	normal	0

Tabela 2. Sumário de unidades formadoras de colônia a partir de 3 amostras de CB contendo uma amostra de par compatível a partir do método de punção venosa e do método de perfusão de placenta por máquina

Amostra Número	CFU-GM (a)		CFU-GEMM (b)		BFU-E	
	*VP	**PL	VP	PL	VP	PL
1	366 ± 59	110 ± 42	2 ± 0,7	6 ± 0,7	1 ± 0	0

Amostra Número	CFU-GM (a)		**PL	CFU-GEMM (b)		BFU-E	
	*VP			VP	PL	VP	PL
2	608 ± 36	197 ± 36	4 ± 0,7	12 ± 1,4	0	7 ± 0,7	
3	650 ± 173	243 ± 40	1 ± 1,4	9 ± 3	0	3 ± 1,4	

CFU-GM: unidade formadora de colônia - granulócito macrófago

CFU-GEMM: unidade formadora de colônia - granulócito, eritrócito, monócito

BFU-E: unidade formadora de broto - eritróide

a e b: teste t pareado mostraram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

5 entre punção venosa e perfusão de placenta por máquina.

*VP: método de punção venosa

**PL: método de PMPP

Tabela 3. Características de fenótipo de células-tronco CB coletadas via método de punção venosa ou método de PMPP

Paciente N°	VP* TMNC** *	PI.** TMNC	VP CD34+ PL CD34+	VP CD34+38-	PL CD34+/38-	VP CD34+38+	PL CD34+38+
Paciente 1	50 x 10 ⁶	63 x 10 ⁶	1,1 ^a (2.2) ^b 2,7 ^a (4,4) ^b	0,12 ^a (0,2) ^b	0,92 ^a (1,5) ^b	1,0 ^a (2) ^b	1,9 ^a (3) ^b
Paciente 2	200 x 10 ⁶	72 x 10 ⁶	4,9 ^a (2.5)	0,66(0,3)	1,98(2,8)	3,1(1,5)	4,3(6)
Paciente 3	770 x 10 ⁶	300 x 10 ⁶	15(2)	2,7(0,35)	42(14)	16,2(2)	16,6(5,5)
Paciente 4	840 x 10 ⁶	100 x 10 ⁶	1,76(0,2)	1,6(0,19)	1,43(1,43)	2,18(2,6)	0,82 (0,82)
Paciente 5	115 x 10 ⁶	1290 x 10 ⁶	2,4(2)	0,44(0,4)	65(5,1)	1,9(17)	50(3,9)

Paciente N°	VP* TMNC** *	PL** TMNC	VP CD34+ PL CD34+	VP CD34+38-	PL CD34+/38-	VP CD34+38+	PL
Paciente 6	520 x 10 ⁶	260 x 10 ⁶	8,3(1,6) 28,6(11)	2,4(0,46)	19,2(7,4)	5,9(1,14)	9,5(3,65)
Paciente 7	790 x 10 ⁶	47 x 10 ⁶	18,2 (2,23)	5,2(0,66)	0,86(1,82)	12,4 (1,57)	0,78 (1,65)
Paciente 8	1260 x 10 ⁶	330 x 10 ⁶	6,99 (0,55)	0,5(0,04)	4,29(1,3)	6,43 (0,51)	11,2 (3,38)

*VP: método de punção venosa

**PL: método de PMPP

**TMNC: células mononucleares totais

a: x 10⁶

b: percentagem de células mononucleares totais

Tabela 4. Características de fenótipo de células-tronco CB coletadas via métodos de punção venosa ou método de PMPP

Paciente Nº	VP* CD33+	PL** CD33+	VP CD33+34 +	PL CD33+34+	VP CD33+38-	PL CD33+38-	VP CD33++34 -	PL CD33+34-
Paciente 1	1,3 ^a (1,0) ^b	1,4 ^a (2,3) ^b	0,32 ^a (0,6) ^b	0,84 ^a (1,3) ^b	0,08 ^a (1,5)	0,61 ^a (9,7) ^b	1 ^a (2) ^b	0,6 ^a (0,96) ^b
Paciente 2	2,3 (2,5)	4,9 (6,8)	0,6 (0,3)	1,3 (1,8)	1,1 (0,57)	4,1 (5,6)	1,9 (0,97)	3,6 (5)
Paciente 3	0,46 (0,6)	3,8 (1,2)	0,54 (0,7)	3,7 (1,2)	0(0)	3,7 (1,25)	0(0)	0(0)
Paciente 4	0(0)	0,8 (0,8)	0(0)	0,35 (0,35)	0(0)	0,88 (0,88)	0(0)	0,43 (0,43)
Paciente 5	0,43 (0,37)	26 (2,1)	0,6 (0,53)	16,5 (1,3)	0(0)	27 (2,1)	0(0)	9,9 (0,77)

Paciente N°	VP* CD33+	PL** CD33+	VP CD33+34 +	PL CD33+34+	VP CD33+38-	PL CD33+38-	VP CD33++34 -	PL CD33+34-
Paciente 6	1,8 (0,35)	11,2 (4,3)	1,5 (0,29)	7,5 (2,9)	0,4 (0,08)	9,5 (3,65)	0(0)	4,4 (1,7)
Paciente 7	0(0)	0,55 (1,18)	0(0)	0,35 (0,74)	0(0)	0,49 (1,04)	0(0)	0,21(0,44)
Paciente 8	1,51 (0,12)	1,65 (0,5)	1,89 (0,15)	1,68 (0,51)	0(0)	2,54 (0,77)	0(0)	0,03(0,01)

*VP: método de punção venosa

**PL: método de PMPP

**TMNC: células mononucleares totais

a: x 10⁶

5 b: percentagem de células mononucleares totais

REIVINDICAÇÕES

1. Método de coleta de células-tronco de sangue de cordão umbilical **caracterizado pelo** fato de compreender:

fornecimento de uma placenta de mamífero isolada, não exsanguinada, compreendendo sangue de cordão umbilical compreendendo células-tronco de sangue de cordão umbilical;

perfusão pulsátil de máquina da placenta de mamífero isolada, não exsanguinada, com um escoamento mediado por pressão de uma solução de perfusão, para produzir um perfusato compreendendo sangue de cordão umbilical compreendendo células-tronco de sangue de cordão umbilical; coleta do perfusato; e

isolamento das células-tronco de sangue de cordão umbilical a partir do perfusato para produzir células-tronco de sangue de cordão umbilical isoladas.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de a perfusão ser utilizando uma fonte de pressão.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de compreender adicionalmente, após o fornecimento, manter a placenta de mamífero isolada em gelo, para produzir uma placenta de mamífero resfriada.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de a solução de perfusão compreender heparina.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de a perfusão compreender perfusão via uma ou duas artérias umbilicais.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pelo** fato de a perfusão compreender adicionalmente a canulação de uma ou duas artérias umbilicais para produzir uma placenta canulada; e a colocação da placenta canulada em um circuito de perfusão.

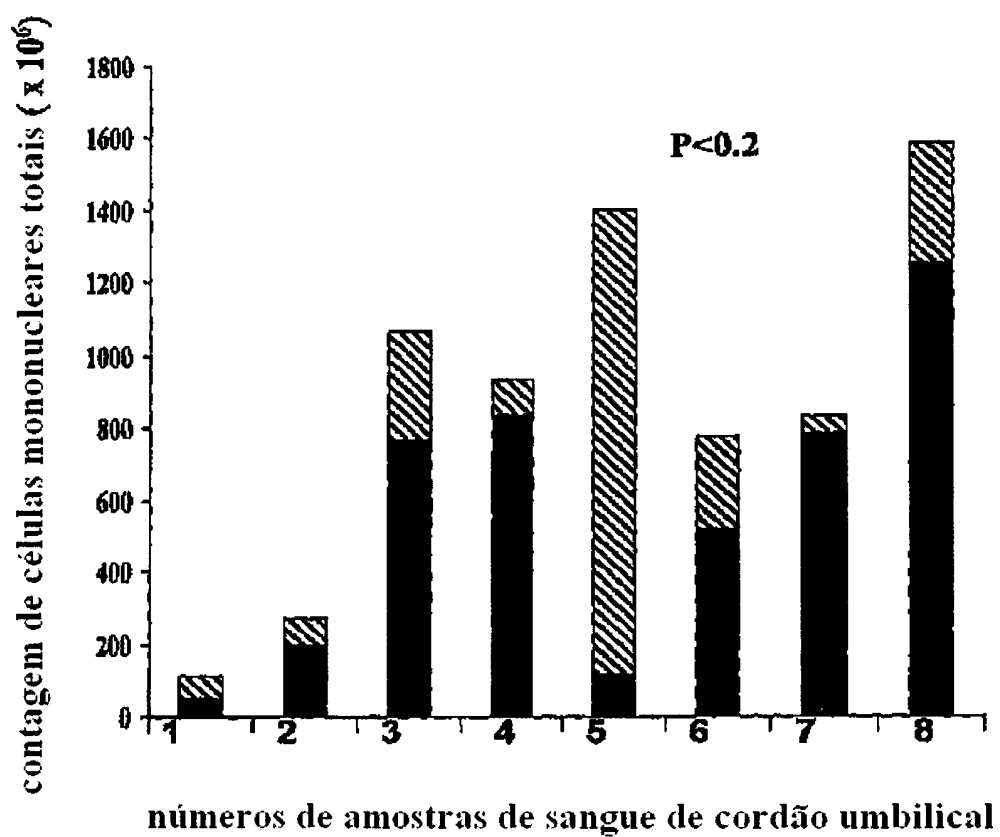


FIGURA 1

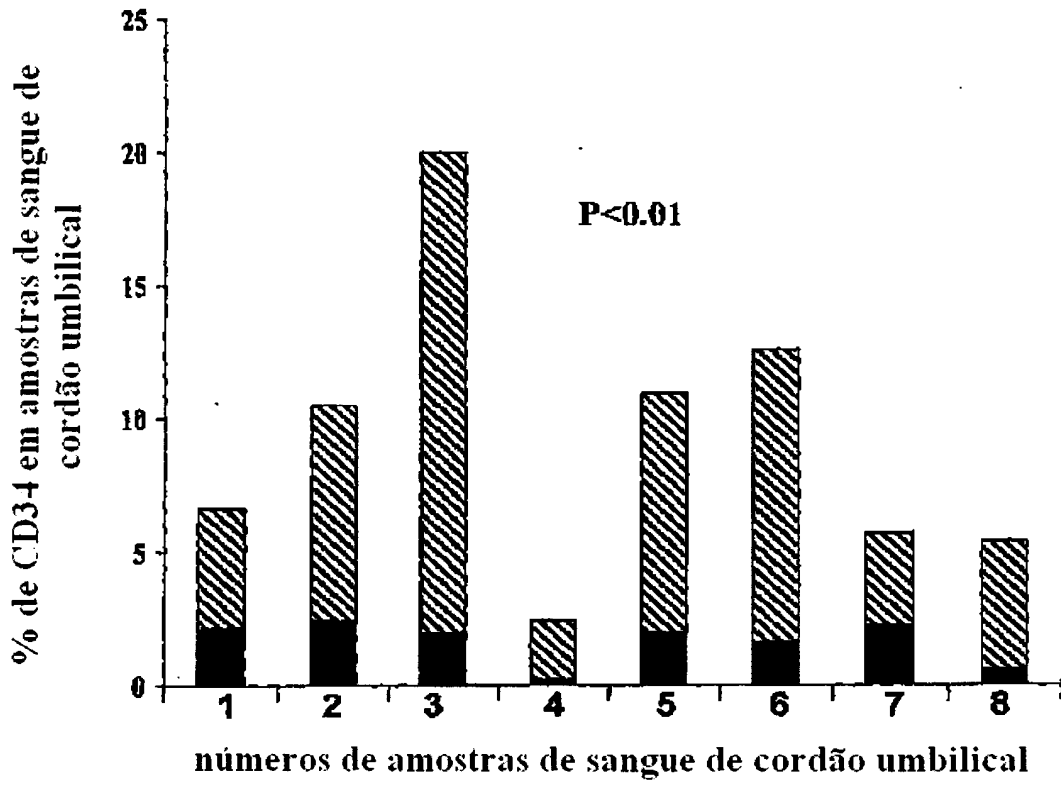


FIGURA 2

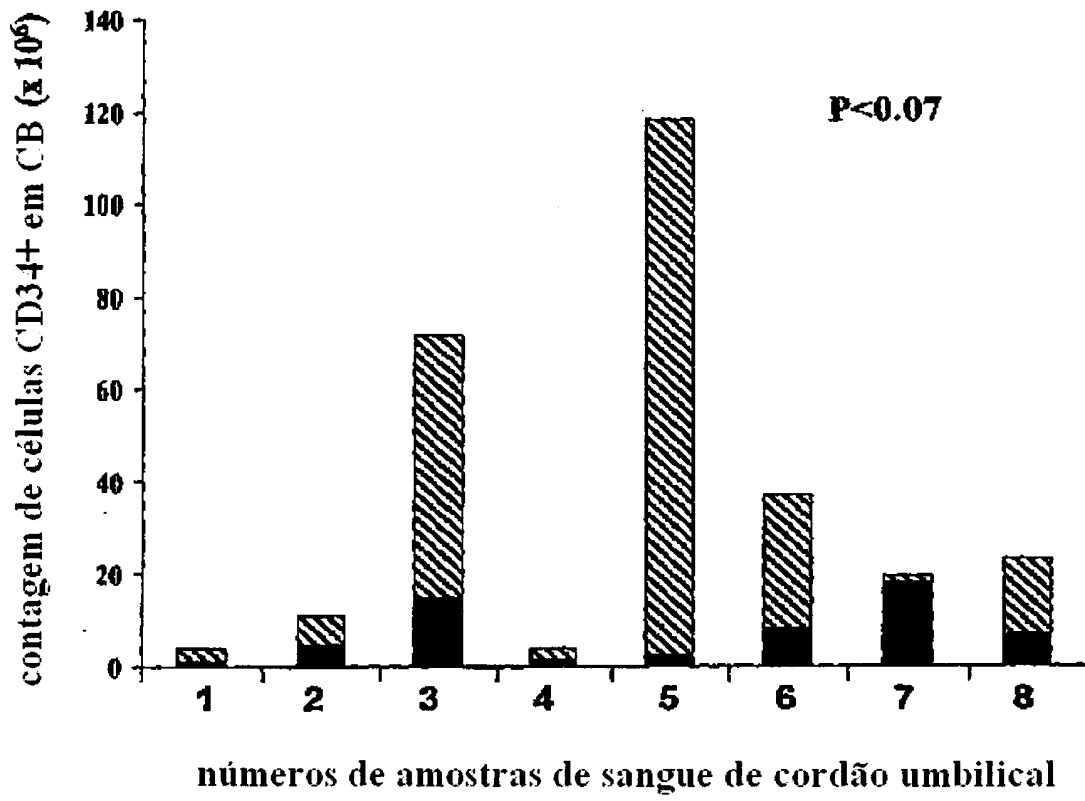


FIGURA 3

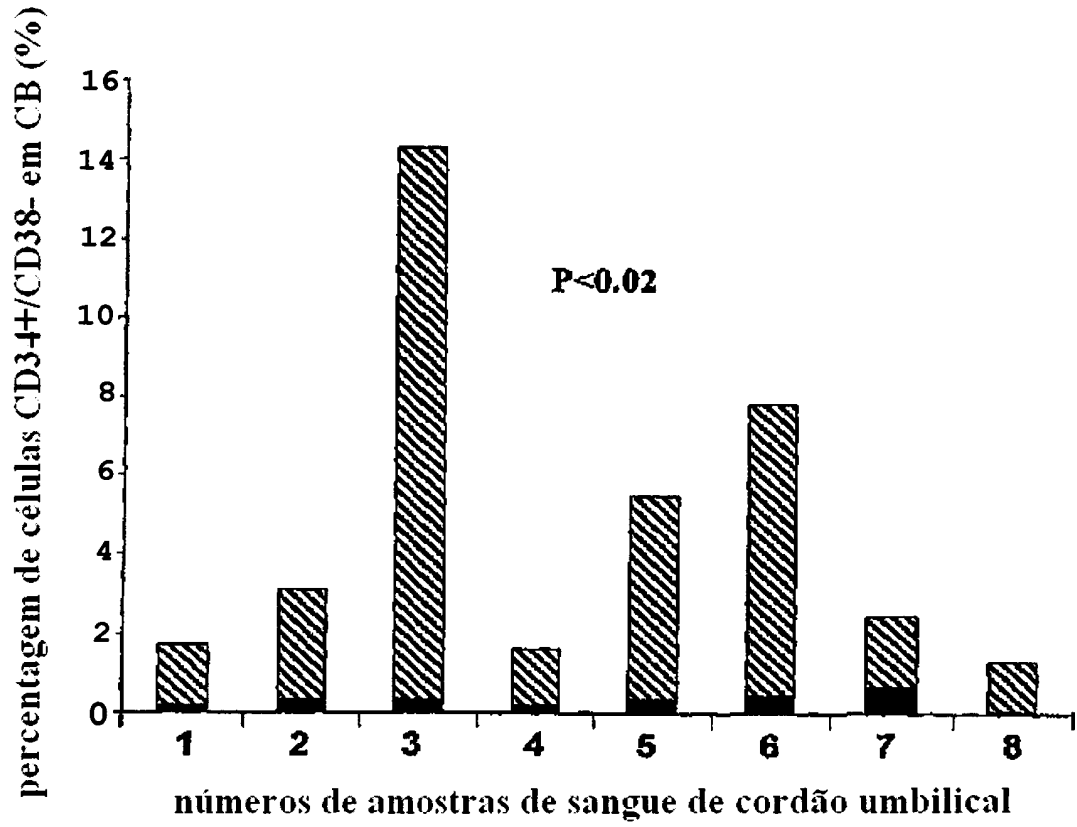


FIGURA 4

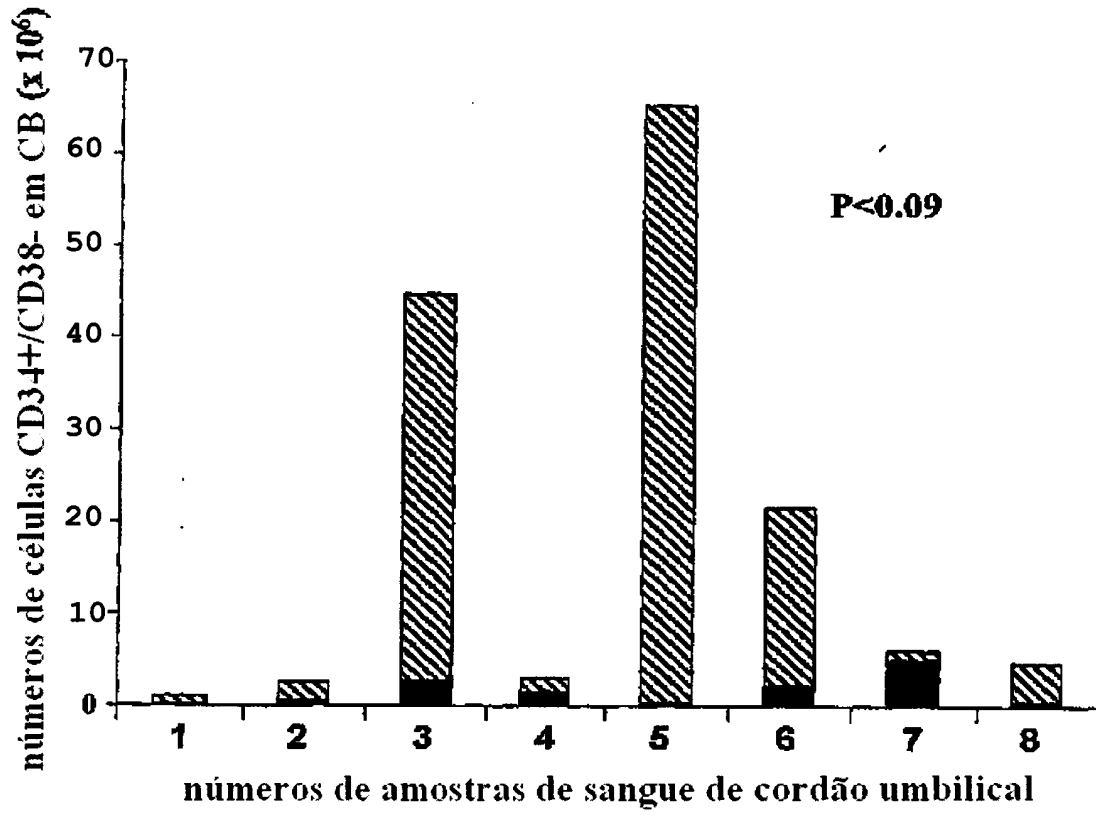


FIGURA 5

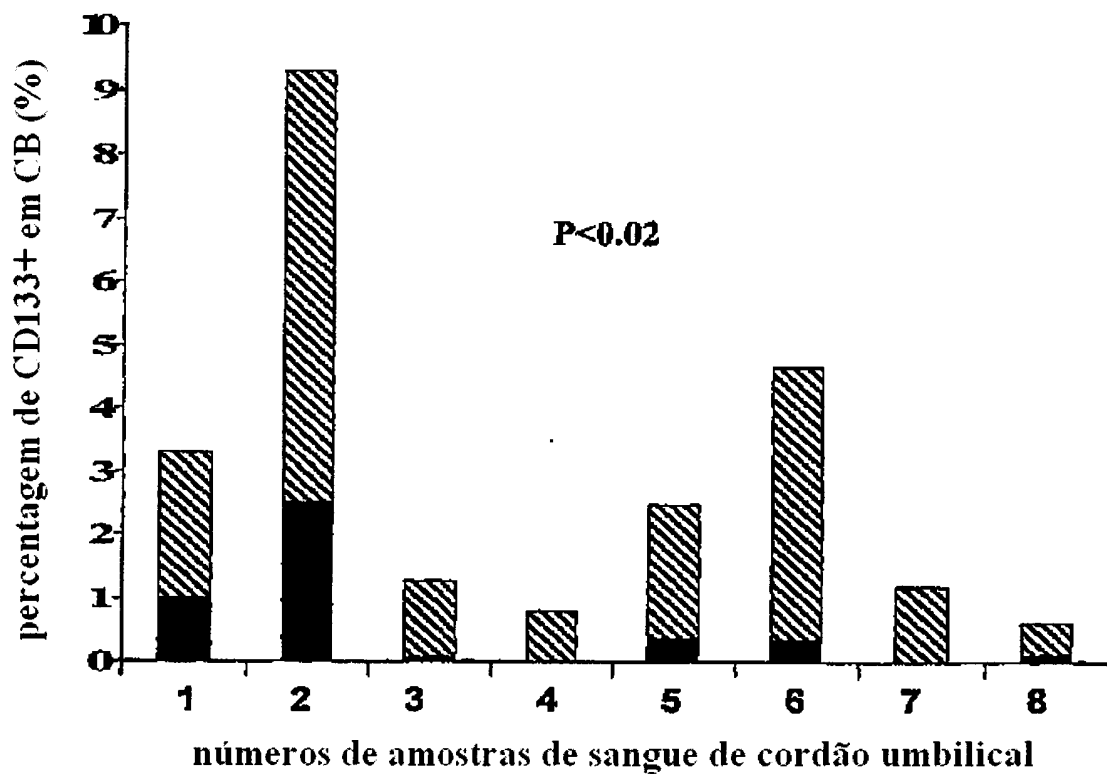


FIGURA 6

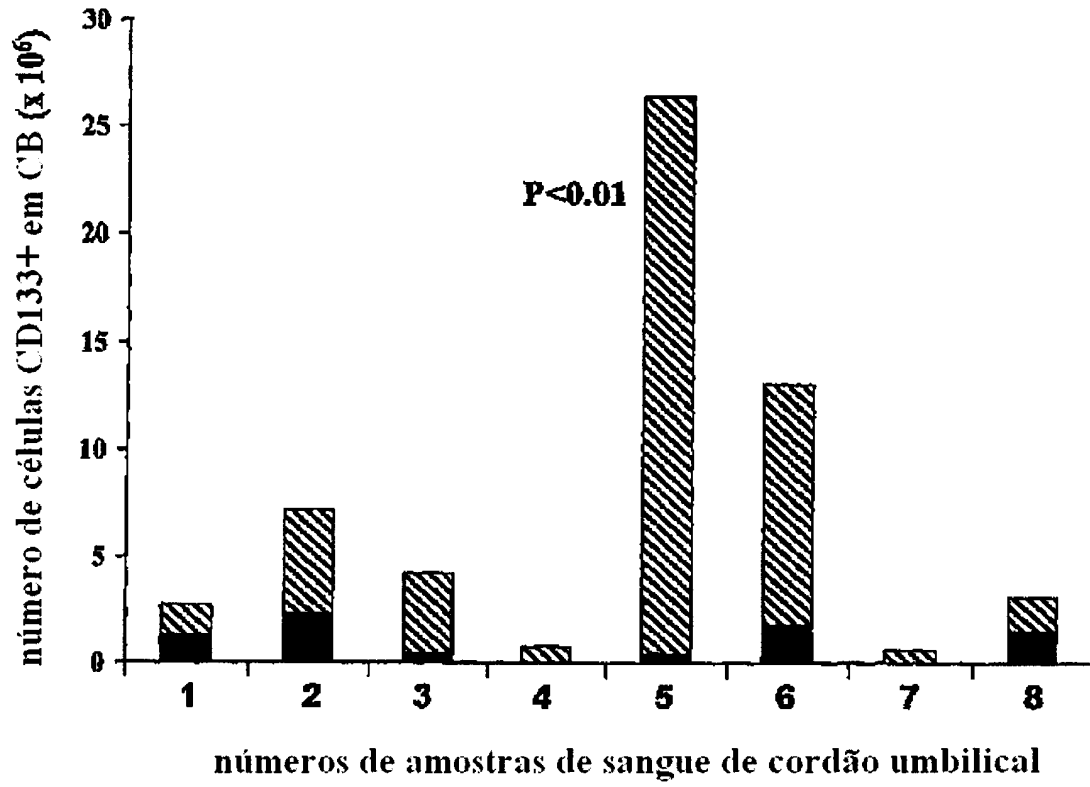


FIGURA 7

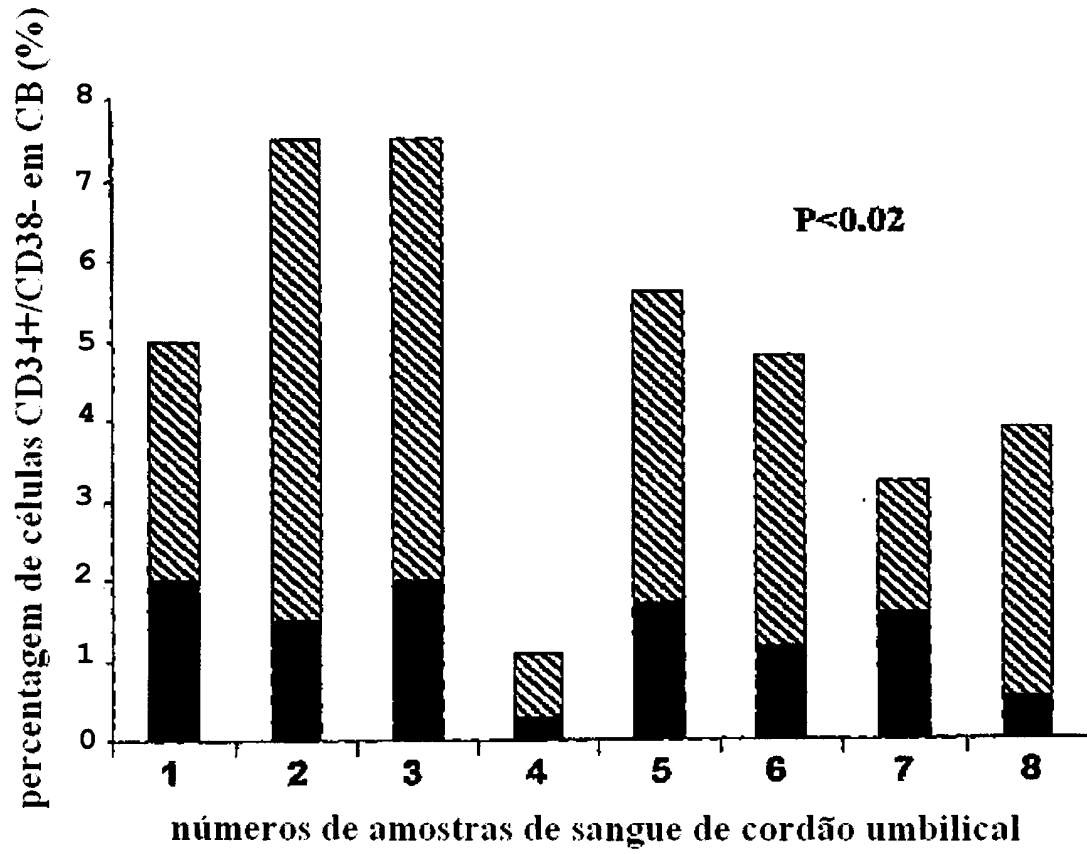


FIGURA 8A

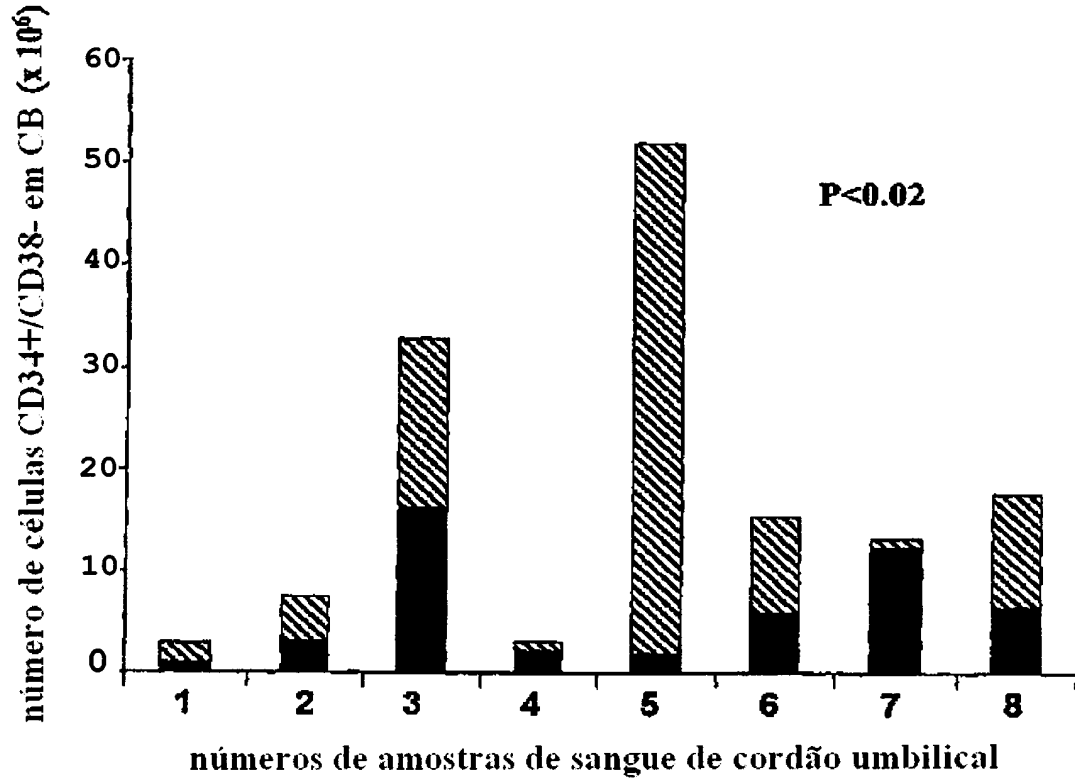


FIGURA 8B

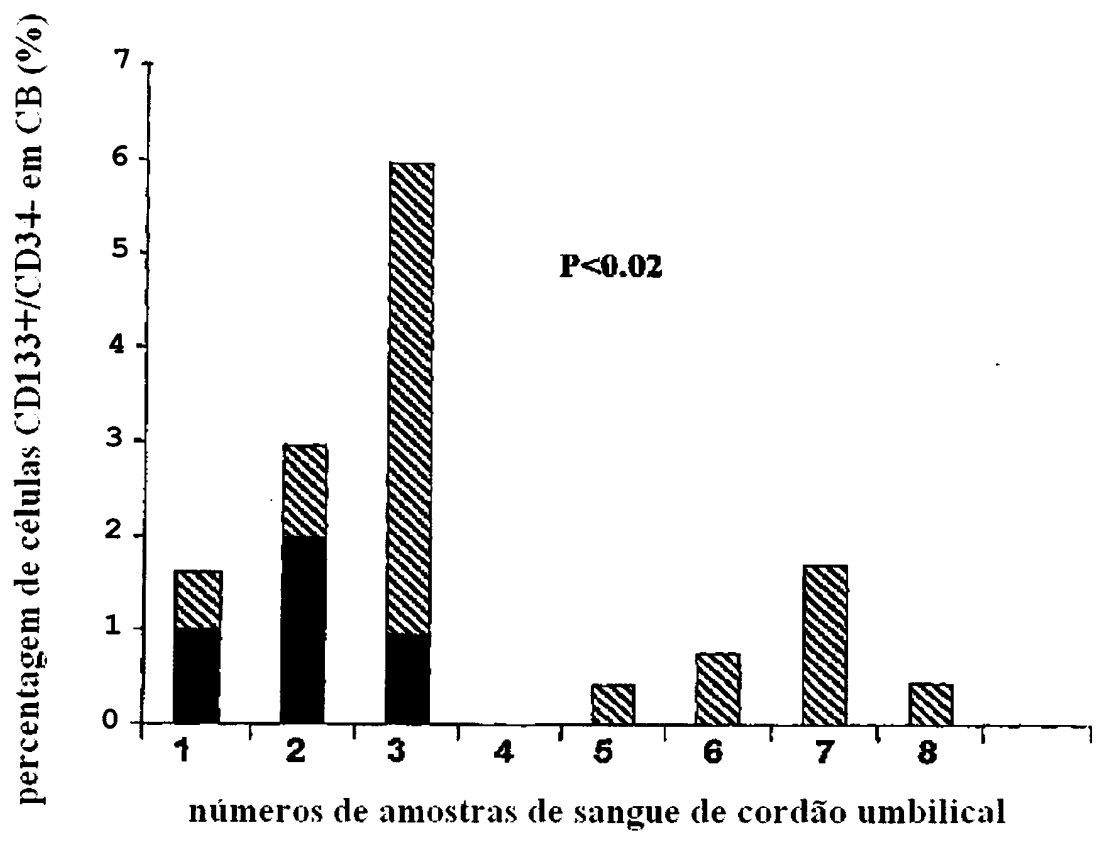


FIGURA 9A

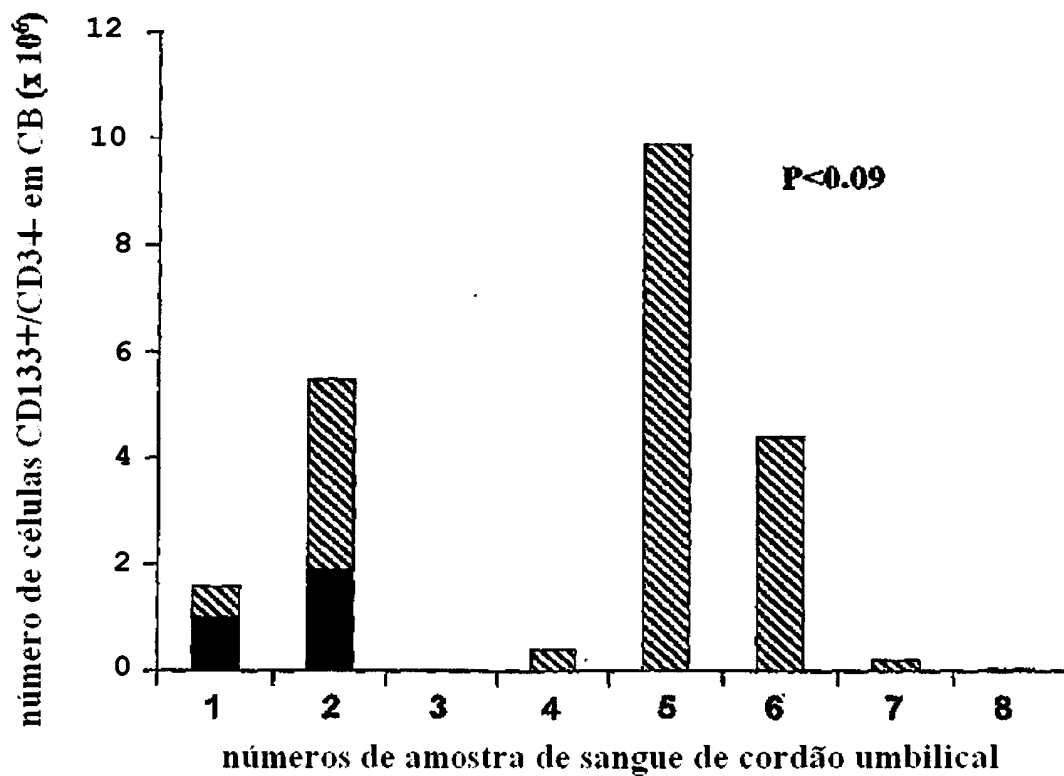


FIGURA 9B

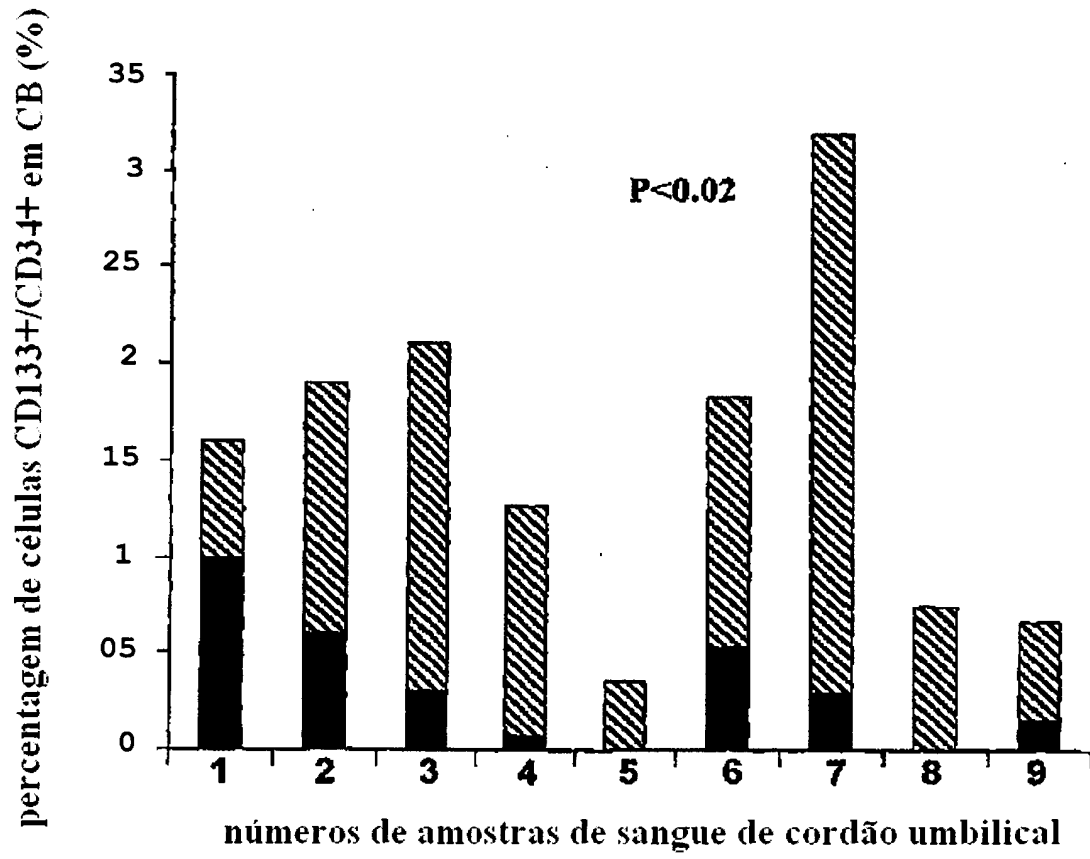


FIGURA 10A

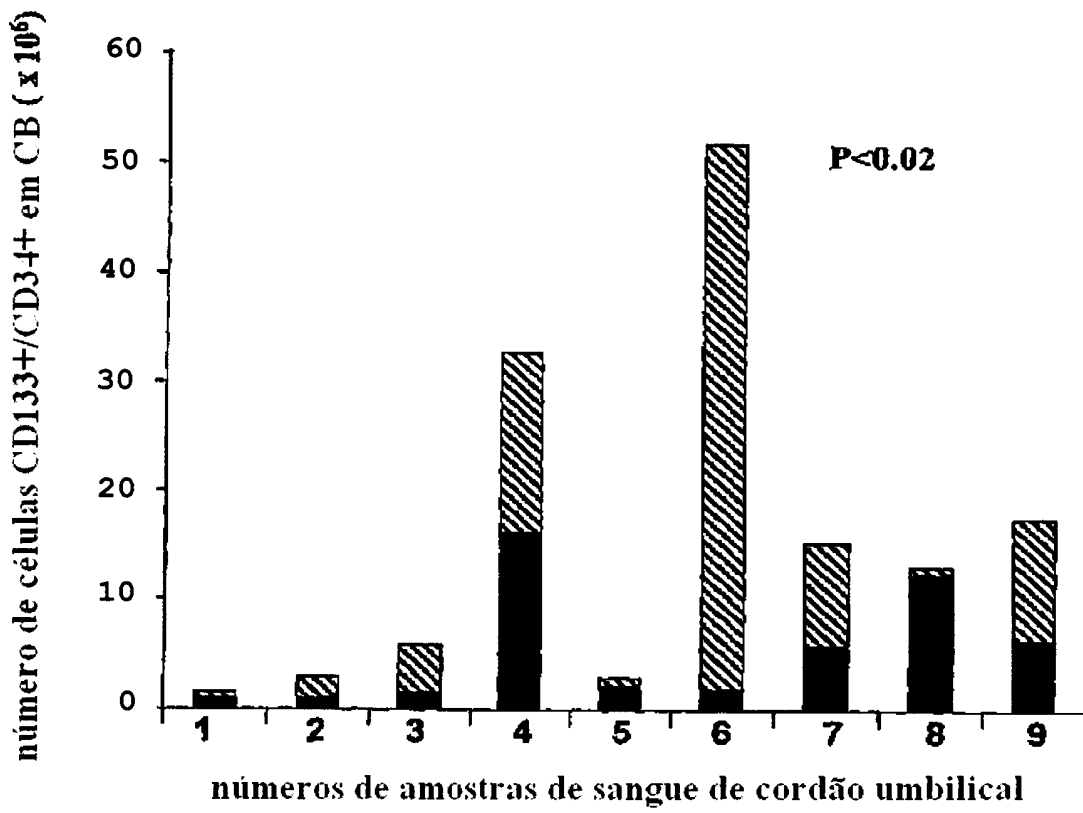


FIGURA 10B