



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

(21) **PI0621107-0 A2**

(22) Data de Depósito: 21/12/2006
(43) Data da Publicação: 29/11/2011
(RPI 2134)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 5/08
A61K 35/44
C12N 5/06

(54) Título: MÉTODO DE RECUPERAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL, MÉTODO DE PRESERVAÇÃO DA VIABILIDADE DE CÉLULAS PRESENTES NO TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL, TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL E MÉTODO DE RECUPERAÇÃO DE HUCPVCs VIÁVEIS

(30) Prioridade Unionista: 22/12/2005 US 60/752,989

(73) Titular(es): Jane Ennis, John E. Davies, Rahul Sarugaser

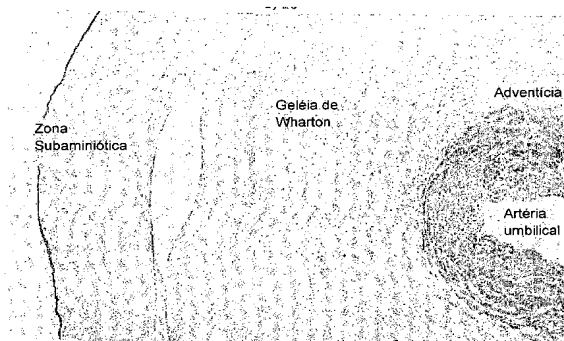
(72) Inventor(es): Jane Ennis, John E. Davies, Rahul Sarugaser

(74) Procurador(es): Ana Paula Santos Celidonio

(86) Pedido Internacional: PCT CA2006002092 de 21/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/071048de 28/06/2007

(57) Resumo: MÉTODO DE RECUPERAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL, MÉTODO DE PRESERVAÇÃO DA VIABILIDADE DE CÉLULAS PRESENTES NO TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL, TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL E MÉTODO DE RECUPERAÇÃO DE HUCPVCs VIÁVEIS. A presente invenção refere-se a células progenitoras viáveis são extraídas a partir de um tecido de cordão umbilical congelado. Em algumas realizações, o tecido de cordão umbilical é um vaso sanguíneo que possui geléia de Wharton perivascular, e onde as células progenitoras extraídas são HUCPVCs.



“MÉTODO DE RECUPERAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL, MÉTODO DE PRESERVAÇÃO DA VIABILIDADE DE CÉLULAS PRESENTES NO TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL, TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL E MÉTODO DE RECUPERAÇÃO DE HUCPVCs VIÁVEIS”

5

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à coleta de uma população de células humanas que proliferam rapidamente a partir do tecido conectivo do cordão umbilical (UC), a cultura dessas células em condições osteogênicas, condrogênicas, adipogênicas e miogênicas, a demonstração de uma elevada porcentagem de células nestas populações que são imunologicamente incompetentes, como demonstrada pela sua falta de antígenos de histocompatibilidade na superfície celular, bem como a capacidade destas células de serem utilizadas como fonte de células progenitoras multipotentes para diversas terapias à base de células. Mais particularmente, a presente invenção diz respeito à utilização de tecidos congelados como uma fonte valiosa para essas células progenitoras.

15

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O cordão umbilical (UC) é uma das primeiras estruturas a formar a seqüência de gastrulação (formação das três camadas germinais embrionárias). Quando o dobramento é iniciado, o disco embrionário torna-se conectado, pelo intestino intermediário primitivo (embrionário) ao saco vitelino primitivo (extra-embriônico), através dos vasos vitelínico e alantóico que, desenvolvem-se para formar os vasos umbilicais (Haynesworth *et al.*, 1998; Pereda e Motta, 2002; Tuchmann-Duplessis *et al.*, 1972). Estes vasos são suportados em, e rodeado pelo, que é geralmente considerado, tecido mesenquimal primitivo principalmente de origem extra-embriônica denominado de geléia de Wharton (WJ) (Weiss, 1983). A partir desta fase inicial, a UC

25

5 cresce, durante a gestação, para se tornar um cordão de 30-50 centímetros. Pode-se esperar, portanto, que a WJ contenha não só fibroblastos, ou miofibroblastos como células que foram descritas na literatura (vide abaixo), mas também populações de células progenitoras que podem dar origem a células da expansão do volume da WJ necessárias para apoiar o crescimento do cordão durante o desenvolvimento embrionário e fetal.

A WJ foi descrita primeiramente por Thomas Wharton, que publicou em seu tratado *Adenographia* em (1656) (TW Wharton. *Adenographia*. Traduzido por Free S. (1996). Oxford, UK: *Oxford University Press*, 1656; 242-10 248). Ela foi, posteriormente, definida como uma gelatinosa, tecido conectivo mucoso frouxo composto de células dispersas em um terreno amorfo composta de substâncias de proteoglicanos, incluindo ácido hialurônico (Schoenberg *et al.*, 1960), e diferentes tipos de colágenos (Nanaev *et al.*, 1997). As células dispersas na matriz têm sido descritas como "parecidas com fibroblastos" que são estrelados em forma de cordão colapsados e alongados em cordão 15 distendido (Parry, 1970). Células musculares lisas inicialmente foram observadas no interior da matriz (Chacko e Reynolds, 1954), embora isto foi contestado por Parry (1970) que descreveu-as como "fibroblastos incomuns" que superficialmente lembram células musculares lisas. Posteriormente, pouco 20 trabalho havia sido feito para caracterizar estas células até que em 1993, quando Takechi *et al.* (1993) realizaram pesquisas imuno-histoquímicas nessas células. Eles descreveram as células como "parecidas com fibroblastos" que eram "fusiformes ou estreladas com longos processos citoplasmáticos e rede de fibras de colágeno onduladas, em uma superfície de substância amorfa" 25 (Takechi *et al.*, 1993). Para a coloração imuno-histoquímica, eles utilizaram anticorpos primários contra actina e miosina (proteínas citoplasmática contrateis), vimentina (característica de fibroblastos de origem mesenquimal embrionária) e desmina (específico de células de origem miogênicas), a fim de

determinar que tipo de miosina estavam associadas com os fibroblastos da WJ. Eles observaram altos níveis de actinmiosina quimicamente extraíveis, e embora os fibroblastos contenham actinmiosina no citoplasma, eles não coram positivamente para actina ou miosina, enquanto os fibroblastos WJ coram positivamente para ambas. Adicionalmente, colorações positivas para ambas, vimentina e desmina foram observadas levando a conclusão de que estes fibroblastos modificados na WJ foram derivados de tecidos mesenquimais primitivos (Takechi *et al.*, 1993). Em um estudo mais recente, Nanaev *et al.* (1997) demonstraram cinco etapas da diferenciação das células progenitoras mesenquimais proliferam no cordão prematuro. Seus achados suportaram a sugestão de que os miofibroblastos existem dentro da matriz da WJ. A caracterização por imuno-histoquímica das células da WJ, mostra notáveis semelhanças com a de pericitos que são reconhecidamente uma das principais fontes de células osteogênicas na morfogênese óssea e também pode formar nódulos ósseos referidos como unidade formadora de colônia - osteoblastos (UFC-O) (Aubin, 1998) em *culture* (Canfield *et al.*, 2000).

Publicações recentes tem comunicado métodos para coleta de células a partir do UC, em vez do sangue do UC. Mitchell *et al.* (Mitchell *et al.*, 2003) descrevem um método em que primeiro é removido e descartado os vasos umbilicais para a coleta de tecidos remanescentes. Este último, que irá incluir tanto a WJ restantes (alguns dos quais terão sido descartados com os vasos, uma vez que os vasos umbilicais são totalmente envoltos pela WJ) quanto o epitélio amniótico, é, então, picado para produzir pequenos fragmentos de tecidos que são transferidos para placas de cultura de tecidos. Estes fragmentos de tecidos são então utilizados como explantes primários a partir de células que migram para o substrato da cultura.

Em outra publicação, Romanov *et al.* (2003) indicam que foram bem sucedidos em isolar células similares a células tronco mesenquimais a

partir de vasos do cordão, embora eles também indicarem que suas culturas não continham células da WJ. Especificamente, eles empregam uma única digestão com colagenase por 15min, dentro da veia umbilical, o que gera uma população mista de células vasculares endoteliais e células sub-endoteliais.

5 Romanov *et al.* mostram que o número esparsos de células similares a fibroblastos aparecem a partir desta coleta de células após 7 dias.

Além disso, a patente US 5.919.702 descreve um método de isolar "pré-condrócitos" a partir da WJ do UC humano, e seu uso para produzir cartilagem. Particularmente, o método compreende em cortar longitudinalmente
10 uma seção do cordão, dissecando os vasos sanguíneos e o "revestimento", que são depois descartados, e então coletando a WJ em um recipiente estéril, e foi cortado em seções de 2 a 3 milímetros para o cultivo. Em um método preferido, as células são isoladas, colocando cortes de 2 a 3 milímetros da WJ sobre uma lâmina de vidro no fundo de uma placa de Petri, cobrindo-a com
15 outro corte, e cultivando por 10-12 dias, a fim de permitir que os "pré-condrócitos" migrem para fora para a superfície da placa de cultura.

Em um pedido de patente US 2005/0148074 publicado em 7 de julho de 2005, Davies *et al* descrevem o isolamento de uma única população de células progenitoras a partir de uma determinada região da geléia de Wharton, denominada região perivascular. Na região da geléia de Wharton,
20 está em ou é associada às paredes externas dos vasos do cordão, e permanece associada com os vasos quando são excisadas a partir do cordão. A população de células progenitoras tem um tempo extremamente curto de duplicação, e compreende as células progenitoras que têm uma grande variedade de propriedades valiosas, incluindo células que são multipotentes e
25 dão origem a vários tecidos mesenquimais, incluindo gordura, osso, cartilagem, músculo e endotélio; células que diferenciam espontaneamente em osteoblastos formadores de osso e células que não possuem marcadores MHC

Classe I e Classe II. Células progenitoras obtidas a partir da geléia de Wharton, na região perivascular da vasculatura do cordão umbilical humano são mencionadas neste documento como HUCPVCs.

O tecido do cordão, assim, promete ser uma importante fonte de células progenitoras para uso na engenharia dos tecidos e outros procedimentos médicos. As práticas atuais permitem um longo prazo de armazenamento de células derivadas do cordão sob condições criogênicas, e a recuperação de células viáveis desta. No entanto, técnicas necessitam ainda serem desenvolvidas para permitir a recuperação da viabilidade das células a partir de tecido de cordão ou congelado e armazenado criogenicamente, o que a diferencia a partir de células do cordão *per se*. Assim, quando é exigida a recuperação da viabilidade das células do tecido do cordão, os técnicos do assunto são obrigados a agir rapidamente para processar tecido ainda quando este é fresco, normalmente dentro de 24 horas a partir de extração do cordão, a fim de que o tecido desejado possa ser extraído, e as células desejadas possam ser isoladas, cultivadas e armazenadas por congelamento, enquanto as células ainda são viáveis. Evidentemente, seria útil fornecer um método que permita com que o tecido do cordão possa ser armazenado, para servir como uma fonte de uso imediato de células viáveis.

20

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

Determinou-se agora que células viáveis possam ser recuperadas a partir de células do cordão umbilical de tecidos que foram congelados. Assim, a presente invenção contempla a prática de um "banco" de tecidos criogênicos, com uma base pós-parto, a fim de fornecer um recurso duradouro de uso imediato para a extração de células viáveis a partir de tecidos de cordão congelados.

25

Mais particularmente, e de acordo com um dos seus aspectos, a atual invenção compreende as etapas de obtenção do tecido do cordão

umbilical pós-parto, e o congelamento do tecido do cordão umbilical pós-parto. Em um aspecto preferido, a presente invenção é aplicada de modo a manter a viabilidade das células presentes no tecido do cordão umbilical, usando um método que compreende as etapas de obtenção do tecido do cordão umbilical composto de células viáveis, combinando o tecido do cordão umbilical com uma solução que inclua uma solução de criopreservação compreendendo um meio de cultura celular contendo soro e um crioprotetor, e permitindo a combinação em um processo de congelamento na qual a combinação é, primeiro refrigerada como um líquido, durante um período e a uma temperatura que permita com que o crioprotetor penetre no tecido e, em seguida, congelando a combinação refrigerada, e armazenando a combinação congelada sob condições criogênicas.

De acordo com outro aspecto da invenção, a presente invenção fornece um método viável para a obtenção de células do tecido do cordão umbilical, compreendendo as etapas da obtenção de tais tecidos na forma congelada, o descongelamento do tecido congelado, e a extração das células viáveis a partir do tecido descongelado. Em um aspecto preferido, a presente invenção é aplicada na recuperação de células viáveis do tecido do cordão, utilizando um método que compreende as etapas de obtenção do tecido do cordão que está congelado, e opcionalmente é armazenado criogenicamente, particularmente pelo método da presente invenção, descongelando o tecido congelado, lavando o tecido descongelado para remover o crioprotetor, e extraíndo células viáveis a partir do tecido resultante.

Assim, em outro de seus aspectos, o presente invenção fornece um método viável para a obtenção de células do tecido de cordão umbilical, onde as células são extraídas do tecido do cordão umbilical previamente congelado.

Em outro aspecto, a presente invenção fornece o tecido de

cordão umbilical, em um estado congelado e, opcionalmente, em um estado criopreservado, contendo as células progenitoras que são recuperáveis a um estado viável, quando preparadas pelo método da presente invenção.

5 Em um aspecto relacionado da invenção, é fornecido o tecido do cordão umbilical, sob a forma de um banco de tecidos, que compreende uma variedade de recipientes contendo cada um uma amostra de tecido de cordão congelado, e um catálogo referenciando o conteúdo de cada recipiente. Em um exemplo de realização, os recipientes são recipientes adequados para o armazenamento criogênico.

10 Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método que compreende as etapas de obtenção de células viáveis a partir de tecidos de cordão umbilical anteriormente congelado, e selecionando a partir de células deste tecido, células progenitoras viáveis. Em um aspecto particular, as células progenitoras são células HUCPVCs e a invenção fornece um método de
15 recuperação das HUCPVCs viáveis a partir de tecidos de cordão umbilical congelado, que compreende as etapas de:

1) Obtenção de tecido de cordão congelado, no qual o tecido de cordão congelado é opcionalmente armazenado criogenicamente, no qual o tecido do cordão é fresco, isolado de vaso de cordão umbilical humano, ou um
20 segmento dele, tendo associados à geléia de Wharton perivascular, e foi preparada por um método compreendendo as etapas de:

- a) obtenção do dito tecido de cordão umbilical;
- b) combinação do tecido de cordão umbilical com uma solução
crioconservante que compreende meio de cultura celular contendo soro e DMSO;
- 25 c) submeter a combinação a um processo na qual a combinação é refrigerada como um líquido por um período e a uma temperatura que permita com que o DMSO penetre no tecido;
- d) congelar a combinação refrigerada para propiciar tecido de

cordão congelado, e, opcionalmente;

e) armazenamento do tecido de cordão congelado sob condições criogênicas durante um período de tempo; e, em seguida;

2) descongelamento do tecido de cordão congelado;

5 3) tratamento do tecido de cordão descongelado com água para retirar o DMSO, e;

4) digestão da geléia de Wharton, associada com os vasos congelados armazenados para liberação das HUCPVCs viáveis.

Esses e outros aspectos da invenção serão descritos agora em maiores detalhes com referência feita aos desenhos em anexo.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 é uma micrografia em microscópio de luz representando as três diferentes zonas de tecido representadas na UC humana;

15 A Figura 2 é uma ilustração representativa de um vaso em alça na solução de colagenase;

A Figura 3 é uma micrografia em microscópio de luz das células isoladas a partir da WJ que se uniram à superfície da cultura de tecido de poliestireno;

20 A Figura 4 é uma micrografia em microscópio de luz das ilustrando a formação inicial de uma UFC-O;

A Figura 5 é uma micrografia em microscópio luz ilustrando uma UFC-O madura;

A Figura 6 exibe a UFC-O marcada com tetraciclina sob a fluorescência ultravioleta em uma placa de cultura de poliestireno de 35 mm;

25 A Figura 7 ilustra lado a lado, uma micrografia em microscópio luz na fase de contraste e micrografia em microscopia de fluorescência da mesma UFC-O marcada com tetraciclina;

A Figura 8 é uma micrografia de microscopia eletrônica por

varredura de uma UFC-O maduro sobre o tecido de cultura em uma superfície de poliestireno;

A Figura 9 é uma micrografia de microscopia eletrônica por varredura de uma secção transversal de uma UFC-O expondo a matriz subjacente;

A Figura 10 é uma micrografia de microscopia eletrônica por varredura de fibras colágenas levemente mineralizadas localizada na borda de crescimento da UFC-O;

A Figura 11 é uma micrografia de microscopia eletrônica por varredura da matriz não colagenosa (observada como glóbulos) fixadas na interface de poliestireno através da diferenciação de células osteogênicas;

A Figura 12 é uma micrografia de microscopia eletrônica por varredura de fibras colágenas altamente mineralizadas localizada no centro de uma UFC-O madura;

A Figura 13 exhibe os dados da citometria de fluxo que demonstram que as células derivadas WJ são 77,4% MHC I e MHC II negativas;

A Figura 14 é uma reprodução em preto e branco de uma corte transversal de um nódulo ósseo corado por tricrômico de Masson mostrando a distribuição de colágeno dentro dos quais as células se tornaram imobilizadas (osteócitos), e multicamadas de células periféricas algumas das quais estão se tornando rodeada pela matriz extracelular produzida;

A Figura 15 mostra o potencial de expansão da população da WJ perivascular aderente em relação à expansão da subpopulação osteoprogenitora empenhada e subpopulação osteoprogenitora total;

A Figura 16 exhibe a proliferação das células perivascular da WJ a parti de 0-144 horas, ilustrando uma curva normal de crescimento com uma fase de latência de 0-24 horas, fase logarítmica de crescimento de 24-72 horas,

e fase platô de 72-120 horas. O tempo de duplicação durante todo o período de cultura é de 24 horas, enquanto que durante a fase logarítmica de crescimento é de 16 horas;

A Figura 17 exhibe a expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) das células da WJ que demonstraram ao longo de 5 passagens, a mudança em sua expressão devido ao descongelamento livre, e a expressão subsequente devida à repetição da cultura;

A Figura 18 exhibe a frequência UFC-F das HUCPVCs;

A Figura 19 exhibe o tempo de duplicação das HUCPVCs de P0 até P9 das HUCPVCs que demonstra um tempo de duplicação relativamente estável e rápida de 20 horas a partir de P2 até P8, e

A Figura 20 exhibe a proliferação das HUCPVCs demonstrando que $> 10^{14}$ células podem ser obtidas no prazo de 30 dias de cultura. Com esta rápida expansão, 1000 doses terapêuticas (TDs) podem ser geradas no prazo de 24 dias de cultura;

A Figura 21 mostra os efeitos da concentração de colagenase e tempo de digestão nas células colhidas; e

A Figura 22 fornece micrografias de microscopia de luz mostrando a presença de células determinadas com sendo viáveis pela exclusão de Trypan no dia 4 (grupo A) e dia 9 (grupo B) após a recuperação do crioarmazenamento e cultivando em uma superfície de cultura de tecidos tratada com 5% FBS, e alfa-MEM contendo penicilina G (167 unidades/ml), gentamicina (50 $\mu\text{g/ml}$) e anfotericina B (0.3 $\mu\text{g/ml}$). O painel C é uma micrografia de microscopia de luz mostrando, por comparação, os resultados obtidos quando o cordão é congelado após imersão em DMSO 10% sem resfriamento prévio.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção relaciona-se em um aspecto aos métodos úteis para o

armazenamento de tecido de cordão umbilical. Esta prática permite que a futura utilização das células que são histocompatíveis com a de seu paciente fonte, que deverá no futuro necessitar, por exemplo, por razões médicas, de tais células ou tecidos para a reparação ou regeneração.

5 Na presente invenção, o tecido do cordão umbilical é obtido após o parto, e submetidos a congelamento pelo qual o tecido de cordão umbilical congelado é depois armazenado como futura fonte de células viáveis. Para se obter células viáveis a partir do tecido congelado, é permitido ao o tecido o descongelamento e então é extraído para fornecer células que, quando
10 cultivadas, apresentam viabilidade.

O presente método pode ser aplicado a vários tecidos do cordão, tais como a vasculatura incluindo a parede dos vasos e endotélio, a geléia de Wharton, o epitélio amniótico e similares. O cordão do qual esses tecidos são obtidos podem ser de qualquer mamífero, e de preferência é obtido a partir de
15 cordão umbilical humano. Em um exemplo de realização da invenção, o tecido do cordão umbilical é a geléia de Wharton. Em um exemplo de realização preferido, o tecido possui a geléia de Wharton associada com a região perivascular da vasculatura do cordão umbilical, desejavelmente uma vasculatura do cordão umbilical humano. Em outro exemplo de realização da
20 invenção, o tecido de cordão umbilical é um tecido vascular. Em exemplo de realização preferido da invenção o tecido vascular possui a geléia da Wharton, associada com a região perivascular ligada à mesma. Em uma realização particular preferida, o tecido do cordão umbilical a ser congelado é a vasculatura (ou seja, os vasos) associados à geléia de Wharton, que
25 permanece associada aos mesmos, quando é retirada do cordão excisado. Tal tecido do cordão inclui todo o comprimento da vasculatura intacta, vasos individuais, seccionados longitudinalmente a partir dele, no qual o sangue tenha sido opcionalmente removido, e as secções transversais desses tecidos.

Assim, em todos os aspectos da presente invenção, os tecidos de cordão umbilical preferidos são os vasos no tecido de cordão humano que têm a geléia de Wharton e tecidos associados às paredes externas, ou seja, a geléia de Wharton, que se situa no interior da região perivascular do cordão. A geléia da Wharton, que se situa dentro desta região específica é uma rica fonte de células progenitoras que são acima descritas, e mais detalhadamente abaixo. Essa geléia de Wharton está tão intimamente associada a parede dos vasos que o seu isolamento das paredes é um processo difícil. No entanto, a recuperação desta geléia de Wharton perivascular por si só, e sem estar associada ao vaso é tecnicamente possível, e a presente invenção abrange a utilização de tal geléia de Wharton perivascular isolada como tecido de cordão útil como fonte de material para ser congelada, e, opcionalmente, armazenada criogenicamente, para posterior coleta de células progenitoras viáveis.

O tecido de cordão desejável é obtido fresco, como um tecido pós-parto, e após a dissecação opcional para fornecer tecido da natureza que acaba de ser descrito acima, é então preparado para ao congelamento. Preferencialmente, o tecido de cordão é processado dentro de 24 horas a partir de coleta, e os tecidos assim extraídos são congelados, e em um armazenamento criogênico desejável, dentro de, no mínimo, cerca de 72 horas da coleta, e mais desejavelmente no prazo de 48 horas e 24 horas da coleta. O tecido fresco pode ser resfriado durante este período, e é desejável que seja opcionalmente lavado e desinfetado, de acordo com a prática padrão, mas não deve ser congelado durante este período esperado como referido no presente, de modo que a viabilidade celular não seja afetada negativamente.

Em um exemplo de realização preferido, quando os tecidos do cordão que devem ser preservados são os vasos do cordão associados à geléia de Wharton perivascular, os vasos podem ser extraídos como descrito no presente descrito em maior detalhe abaixo, e tal como descrito por Davies et

al, na Patente US2005/0148074. Em resumo, vasos intactos do cordão com geléia de Wharton associadas, são obtidos puxando suavemente os vasos do cordão que foram abertos longitudinalmente e seccionados transversalmente em segmentos de 1-3 centímetros de comprimento, por exemplo, cerca de 4 centímetros. Este processo derrama a maior parte da quantidade da geléia de Wharton no cordão, mas deixa a geléia de Wharton na região perivascular associada aos vasos extraídos. As extremidades dos vasos são amarradas, por exemplo, usando grampos ou sutura para evitar o extravasamento de qualquer sangue remanescente dentro dos vasos. Além disso, ou alternativamente, o sangue dentro dos vasos pode ser removido por lavagens repetidas em veículo adequado, tais como soro fisiológico ou solução salina tamponada, tais como o PBS. A ausência do sangue no espécime nos garante que as progenitoras de origem hematopoiéticas não estão presentes como contaminantes na preparação. No caso em que o sangue é retirado, será apreciado que o segmento dos vasos do cordão útil para armazenamento inclui não só segmentos que tenham sido gerados pela secção transversal dos vasos, mas também segmentos que tenham sido gerados pela secção longitudinal, particularmente dos segmentos transversais, para gerar segmentos que são as tiras de outros segmentos tubulares. Todas as formas de segmentos de vasos do cordão que sustentam a geléia de Wharton perivascular são úteis no presente método.

A fim de preservar o tecido em condições que permitam a recuperação de células viáveis, o tecido de cordão é colocado em num veículo adequado para o processo de congelamento, como qualquer veículo adequado para armazenagem criogênica. Opcionalmente, o veículo ainda inclui um suplemento apropriado para cultivo celular. Em um exemplo de realização, o veículo compreende dimetilsulfóxido (DMSO), por exemplo, 10-30% de DMSO, tais como 15-25% de DMSO, incluindo 20% de DMSO. Em outro exemplo de

realização, no qual o veículo compreende um suplemento para a cultura de células, o DMSO está presente a partir de 1 até 25% dos veículos em termos de volume, por exemplo, 5-20%, como 8-15%, isto é, cerca de 10%. Em outro exemplo de realização, o suplemento é um suplemento à base de soro, como o soro bovino fetal. Em um exemplo de realização específico, o meio de soro bovino fetal, compreende sozinho cerca de 5-20% (por exemplo, 10% ou >15%) em volume de FBS, está presente a partir de 75 a 99% do veículo em termos de volume, tais como 80-95%, ou seja, cerca de 90%. Em um exemplo de realização específico, o veículo compreende 90% do volume de uma solução 10% FBS e 10% DMSO.

Em um aspecto particularmente preferido da invenção, a preparação dos tecidos para o congelamento e opcional armazenamento criogênicos procede através de um processo de refrigeração de transição e gradual que é projetado especialmente para permitir que o criopreservante penetre no tecido de maneira suficiente para proteger os tecidos e células residentes durante o armazenamento e para retirar a água, que ao se congelar irá danificar os tecidos e células. Particularmente, o método de congelamento / criopreservação preferido faz uso de uma solução criopreservante que, como acima referido, compreende um criopreservante e um meio nutritivo para célula assim como um meio de cultura celular que é suplemento com soro. O líquido criopreservante pode ser qualquer agente líquido ou solução, que protege os tecidos e células residentes do efeito prejudicial do congelamento e da formação de gelo. O criopreservante de maior preferência é o dimetilsulfóxido (DMSO). Alternativamente, o criopreservante pode ser glicerol, ou uma mistura de glicerol e DMSO. O glicerol pode ser usado da mesma maneira e nas mesmas concentrações estabelecidas com referência para o DMSO. As propriedades do DMSO tornam este particularmente bem adaptado para o uso no procedimento de

criopreservação.

O meio de cultura suplementado com soro preferido presente na solução crioconservante é soro bovino fetal (FBS). Alternativamente, o meio de cultura pode incluir qualquer meio nutritivo adequado à cultura de células, tais como DMEM, M 199, RPMI-1640 ou similares, ao qual é adicionado um suplemento de soro, tal como FBS, soro humano e similares. Geralmente, mas, dependendo do tipo de meio nutritivo selecionado, o componente soro do meio de cultura será composto por cerca de 5-30% de soro, por exemplo, 10-20% de soro. Tal como referido anteriormente, a solução crioconservante preferida inclui, em volume, cerca de 10% de DMSO, e cerca de 90% de meio de cultura, tal como o FBS.

Para preparar o tecido para o posterior congelamento e armazenagem criogênica, o tecido é combinado com a solução crioconservante e refrigerado como um líquido por um período a uma temperatura e eficaz para que o crioconservante permeie o tecido assim, deslocando desejavelmente a água presente. Para esta proposta, quando o tecido é um segmento de vaso do cordão sustentado pela geléia de Wharton perivascular, o tecido é convenientemente realizado a uma temperatura de cerca de 4 °C por um período de cerca de 15-60 minutos, tal como de 20-40 minutos e, de preferência 30 minutos. Temperaturas mais baixas são menos desejáveis, dado que o DMSO se solidifica abaixo dessa temperatura e tem permeação reduzida no tecido. Temperaturas mais altas são adequadas, mas é conveniente utilizar as temperaturas mais baixas, a fim de retardar os processos metabólicos dentro do cordão durante a movimentação. O tempo de refrigeração pode variar. É desejável estabelecer um equilíbrio de modo a que o crioconservante tenha tempo suficiente para permear o tecido, ao mesmo tempo em que se reduz o tempo durante o qual o cordão é tratado. Em geral, o período de refrigeração não deverá ser inferior a cerca de 10 minutos e

pode chegar até 60 minutos ou mais.

Durante a etapa de refrigeração, os tecidos podem ser incubados dentro de qualquer recipiente adequado, de acordo com a prática normal, como por exemplo, um tubo de centrifugação de 50 mL de volume. Quando os
5 tecidos são vasos de cordão que ostentam a geléia de Wharton perivascular, cada recipiente pode receber cerca de 5 - 10 segmentos de vasos. É útil não encher o recipiente, de forma que não dificulte a permeação do DMSO.

Após a refrigeração, os vasos são sujeitos a um processo de congelamento. Este processo é realizado após a transferência dos tecidos
10 refrigerados a um criorecipiente, de modo que o tecido congelado pode então ser facilmente transferido para o criarmazenamento. Em um exemplo de realização, os vasos são feitas de um polímero não-quebradiço que podem ser esterilizados, tais como polipropileno ou similares, e são fornecidas sob a forma de um tubo ou outro recipiente adaptado para receber um fechamento
15 removível para manter o espécime com o vaso durante o armazenamento e permitir a sua posterior liberação. Mais preferivelmente, cada criorecipiente contém uma amostra de tecido, por exemplo, um segmento de vaso por recipiente, no caso em que o tecido está levando o vaso apoiado sobre a geléia de Wharton perivascular. Os chamados criotubos são adequados, como são
20 sacos de polietileno. Os vasos refrigerados são, então, transferidos para um criorecipiente, e combinado com a solução crioconservante fresca, de preferência em um volume suficiente para mergulhar totalmente os tecidos.

O tecido preparado é então congelado, colocando o espécime em uma unidade de congelamento onde as temperaturas podem ser controladas
25 abaixo do nível necessário para se congelar o tecido. Em um exemplo de realização, o recipiente contendo o tecido e a solução é colocada em um *freezer* para reduzir a temperatura para cerca de -70°C , por exemplo, inferior a -40°C , por um período de, pelo menos, 6 horas, por exemplo, pelo menos cerca

de 8 - 12 horas. Preferencialmente, o congelamento é realizado utilizando um congelador -70°C de taxa controlada.

Será apreciado que o tecido congelado possa ser usado diretamente como matéria-prima de células viáveis que possam ser recuperadas. Tal material congelado, quando mantido a -70°C, pode expor, pelo menos, alguma atividade celular, e, portanto, deve ser utilizado de forma relativamente rápida de modo que a morte celular que pode ocorrer ao longo do tempo a esta temperatura é evitada. Mais preferencialmente, de acordo com o método da presente invenção, os tecidos congelados são colocados em estocagem criogênica, ou seja, é armazenada a uma temperatura em que o metabolismo celular está em estase.

Assim, após o tecido ser congelado, os recipientes contendo os tecidos congelados são transferidos para a estocagem criogênica de preferência, da forma já desenvolvida para o armazenamento de células e tecidos semelhantes. Adequadamente, os recipientes são armazenados na fase de vapor do nitrogênio líquido, ou seja, cerca de -180°C a -200°C. Alternativamente, as células congeladas podem ser criogenicamente armazenadas em meios que não seja nitrogênio líquido, tais como, dióxido de carbono líquido ou halocarbono líquido.

O espécime de tecido pode permanecer neste estado criogênico por longos períodos de dias, semanas, meses ou anos, para a recuperação quando uma fonte de células progenitoras seja necessária.

Quando necessário, células viáveis residentes no tecido armazenado podem ser obtidas utilizando um processo de recuperação de acordo com a presente invenção. Mais particularmente, o tecido recipiente criogenicamente armazenado é obtido primeiro e descongelados a fim de permitir a remoção subsequente do crioconservante. Os tecidos podem ser descongelados, por exemplo, em banho-maria, a uma temperatura geralmente

não superior a 40°C. A temperatura de 10°C a 40°C é adequada, e uma temperatura de 37°C é desejável. Uma vez descongelado, o que leva cerca de 5 a 15 minutos a 37°C, por exemplo, 10 minutos, o tecido pode ser transferido para um recipiente como um tubo 50 mL, e os tecidos são lavados para diluir ou remover o DMSO. A lavagem é realizada utilizando um líquido gelado (por exemplo, refrigerado a 4°C), como água ou soro fisiológico tamponado, por exemplo, PBS, por imersão dos tecidos no líquido. A lavagem vigorosa dos tecidos é desejavelmente evitada, de modo que o choque ou danos causados a células seja minimizado. Os tecidos imersos podem ser mantidos em um refrigerador por um novo período para permitir diluições adicionais e a substituição do crioprotetor por água, e depois diluído ainda mais pela adição de mais líquido refrigerado.

O tecido restaurado resultante pode ser depois utilizado para recuperar células viáveis residentes no tecido, usando as mesmas práticas estabelecidas para a recuperação de células viáveis no tecido de cordão fresco. O presente método permite a recuperação das células que são viáveis a partir do tecido de cordão que foi congelado e armazenado criogenicamente. A viabilidade de tais células pode ser confirmada utilizando qualquer uma das técnicas estabelecidas para esta proposta. Convenientemente, a viabilidade das células recuperadas pode ser confirmada pela simples exclusão do azul de Trypan (um processo que identifica células mortas como incapazes de excluir o corante), ou de forma mais sofisticada, detectando a incorporação de BrdU, para confirmar se a síntese de DNA está ocorrendo. Assim, o termo "viável" é utilizado neste documento com referência às células que apresentam um metabolismo ativo, e que ainda apresentem aderência baseada em células cultivadas, as características de aderência ao substrato da cultura e posterior propagação e multiplicação. Um exemplo de tal viabilidade é mostrado na figura 22, particularmente nos painéis A e B, que demonstram o fenômeno de

disseminação e proliferação característico de HUCPVCs viáveis.

Em exemplos de realizações particulares da invenção, as células viáveis recuperadas a partir do tecido de cordão umbilical armazenadas são células progenitoras. Em outros exemplos de realização particular, as células progenitoras viáveis são recuperadas a partir da geléia de Wharton perivascular associadas com vasos umbilicais armazenados ou segmentos, como exemplificado no presente.

Será apreciado que os processos de armazenagem e recuperação da presente invenção tornar possível a organização dos tecidos de cordão em coleções de armazenamento ou "bancos", que compreende uma variedade de recipientes contendo cada um uma amostra de tecido do cordão umbilical. Essa coleção ou banco de tecidos de cordão umbilical constitui outra realização da presente invenção. Cada banco de tecidos será acompanhado por um catálogo denotando, no que diz respeito a cada amostra, qualquer informação que seja útil para cada amostra, como por exemplo, origem da amostra, com referência ao doador individual e talvez um histórico genético ou médico, a data de armazenamento, a identidade do organismo ou pessoa que produziu a amostra, etc. Com esta abordagem, o banco de tecidos pode servir como repositório para uso futuro dos tecidos e suas células inerentes, bem como o catálogo pode ser usado para selecionar tecidos específicos e células para uso em pacientes específicos ou para o tratamento de doenças específicas.

Para recuperar as células progenitoras viáveis no caso em que o tecido armazenado é um vaso do cordão ou segmentos de vasos apoiado na geléia de Wharton perivascular, poderá ser feito pelos procedimentos descritos em nossos pedidos de patentes internacionais co-pendentes WO04/072273 publicado em 26 de agosto de 2004, e US 2005/0148074, e incorporadas neste documento pela referência. Mais particularmente, o isolamento desses

progenitores de tecido de cordão umbilical fresco, e as suas propriedades e utilizações finais, são descritas a seguir. Estes progenitores são referidos como células humanas de cordão umbilical perivascular "HUCPVCs".

As referências citadas ensinam um procedimento para a extração
5 de células humanas da geléia de Wharton do cordão umbilical, o que gera uma única população de célula caracterizada por uma rápida proliferação, a presença de células osteoprogenitoras e outras células progenitoras humanas, incluindo células que não apresentam nenhum dos marcadores de histocompatibilidade principais (antígeno de leucócito humano (HLA) negativo
10 duplo). A população de células é uma boa fonte de células progenitoras a partir do qual crescem o osso e outros tecidos conjuntivos incluindo cartilagem, gordura e músculos, e para a transferência autogênica e alogênica de células progenitoras para os doentes, para fins terapêuticos.

Mais particularmente, o processo fornece um extrato de geléia de
15 Wharton, em que o extrato compreende células progenitoras humanas e é obtido pela digestão enzimática de geléia de Wharton proximal a vasculatura do cordão umbilical humano, em uma região normalmente chamada de zona perivascular da geléia de Wharton. O procedimento de extração resulta apropriadamente em um extrato que é essencialmente isento de células do
20 sangue do cordão umbilical, de células epiteliais ou de células endotelial do UC e de células derivadas da estrutura vascular do cordão, onde a estrutura vascular é definida como túnica íntima, média e adventícia dos vasos arteriolares ou venosos. O extrato resultante é também distinto dos outros extratos da geléia de Wharton isolada da maior parte da geléia de Wharton que
25 tenha sido separada das estruturas vasculares.

O processo fornece deste modo um método para a obtenção de uma célula progenitora humana, o qual compreende a etapa de isolamento da célula do extrato de Wharton obtido de acordo com a invenção.

O procedimento prevê uma população celular obtida pela cultura de células presentes no extrato da geléia de Wharton incluindo uma população de células osteoprogenitora e uma população de células progenitoras MHC -/-.

A extração de populações de células progenitoras é caracterizada
5 como uma população de células aderentes obtida após o cultivo de células
extraídas sob condições aderentes. Em outro exemplo de realização, a
população de células progenitoras extraída é caracterizada como células não-
aderentes (ou "pós-aderentes") (PA) presentes na fração sobrenadante de
células extraídas cultivadas sob condições aderentes. Esta fração PA é
10 derivada transferindo o sobrenadante das HUCPVCs plaqueadas inicialmente
em um novo frasco T-75 para permitir que as células que ainda não aderiram
se liguem a superfície da cultura. Este processo é repetido com este novo
frasco T-75, transferindo seu meio para outro frasco T-75, a fim de colher todas
as células PA restantes. Esta população de células PA compreende uma
15 subpopulação de células progenitoras que, quando cultivadas sob condições
aderentes, proliferam rapidamente e formam nódulos ósseos e células
adiposas espontaneamente. Esta técnica proporciona um meio para aumentar
o rendimento das células aderentes isoladas a partir da digestão enzimática da
população celular.

20 O procedimento também fornece uma população de células
osteoprogenitoras empenhadas caracterizadas pela propriedade de
diferenciação em células ósseas quando cultivadas na ausência de
suplementos de outra forma exigida para tal diferenciação.

Também é fornecido um método para produzir tecido conjuntivo,
25 incluindo tecido ósseo, cartilagem, tecido muscular e tecido adiposo, no qual
compreende a etapa de sujeição das células obtidas do extrato de geléia de
Wharton a condições que levam à diferenciação dessas células no fenótipo de
tecido conectivo desejado. A este respeito, a invenção também apresenta o

uso de tais células em terapias baseadas em células, incluindo o tratamento mediado por transplante de células de condições médicas, doenças e distúrbios.

Também é fornecida uma composição e seu uso em engenharia de tecidos, compreendendo as células progenitoras de acordo com a invenção ou suas descendentes diferenciadas, e um veículo adequado para a entrega de tais células para o local do tecido escolhido.

A presente invenção fornece um extrato de geléia de Wharton (WJ), como uma fonte de uma população de células que se proliferam rapidamente que compreende células progenitoras humanas incluindo células osteoprogenitoras, bem como células imuno-incompetentes.

A população celular pode ser referida como células de cordão umbilical humano perivascular (HUCPV). A população celular de HUCPV constitui uma rica fonte de células progenitoras multipotentes que são únicas no seu fenótipo, em especial como revelado pela variedade de subpopulações de células nelas contidas. A zona perivascular da geléia de Wharton a partir da qual as células são extraídas podem ser referidas como tecido perivascular.

Tal como aqui empregado, a expressão "células progenitoras" refere-se às células que irão se diferenciar sob condições controladas e/ou definidas em células de um determinado fenótipo. Desse modo, uma célula osteoprogenitora é uma célula progenitora que vai ser consignada à linhagem de osteoblasto, e que vai formar por último o tecido do osso quando cultivada sob as condições estabelecidas para tal consignação e diferenciação. Uma célula progenitora que é "imuno-incompetente" é uma célula que tem um fenótipo que é negativo para os antígenos de superfície associados com os complexos de histocompatibilidade principais (MHC) da classe I e da classe II. Tal célula progenitora também é aqui indicada como um HLA negativo duplo ou como HLA -/-.

A população de células extraídas de WJ também é caracterizada pela "proliferação rápida", a qual se refere à velocidade em que as células extraídas irão crescer em relação a outras populações de células progenitoras conhecidas, sob condições que são padrão para a expansão de células progenitoras. Tal como deve ser apreciado dos resultados experimentais aqui apresentados, e tal como mostrado na Figura 16, a presente população de células progenitoras pode dobrar dentro de pelo menos cerca de 25 horas e tão rapidamente quanto de 7 a 15 horas, e desse modo se expande muito mais rapidamente do que outras populações de células osteoprogenitoras conhecidas e outras populações de células progenitoras extraídas de WJ.

As células e as populações de células da presente invenção podem ser obtidas por meio da extração de WJ do cordão umbilical humano. Ao contrário da técnica anterior, e de acordo com a presente invenção, tais células são extraídas da WJ que é associada, isto é, proximal, à parede exterior da vasculatura umbilical. A geléia de Wharton que é associada ou está muito próxima à superfície externa da vasculatura do cordão que fica dentro de uma região chamada de zona perivascular, e permanece tipicamente associada com a vasculatura quando os vasos são excisados do cordão, tal como é feito, por exemplo, para extrair a geléia de Wharton do cordão, ou para extrair os vasos do cordão e a geléia de Wharton associada. Foi verificado de modo marcante que a geléia de Wharton dentro dessa zona perivascular, e que era tipicamente descartada na prática da técnica anterior, é uma fonte rica de células progenitoras que têm as características aqui descritas. Por conseguinte, a presente invenção explora a geléia de Wharton dessa zona perivascular como uma fonte útil de células progenitoras humanas, denominadas HUCPVCs.

Em exemplos de realização, a população de células HUCPV é caracterizada pela presença de células progenitoras tendo muitos marcadores indicativos de fenótipo funcional mesenquimal (não-hematopoiéticas), ou seja,

CD45-, CD34-, SH2 +, SH3 +, Thy-1 + e CD44 +. De especial significado, a população é geralmente caracterizada como células *harbouring* que são positivas para os anticorpos 3G5, que é um marcador indicativo de pericitos. A extração da população de células em geral é uma população de células fibroblásticas morfológicamente homogênea, que exprime alfa-actina, desmina, e vimentina e proporciona uma fonte muito útil a partir da qual subpopulações celulares desejadas podem ser obtidas pela manipulação das condições de cultivo e de seleção, por exemplo, com base nos princípios e técnicas de triagem celular.

10 Para extrair tais células perivasculares do cordão umbilical humano, é preciso tomar cuidado durante o processo de extração para evitar a extração de células do sangue do cordão umbilical, células epiteliais ou células endoteliais do UC, e células derivadas da estrutura vascular do cordão, onde a estrutura vascular é definida como a túnica íntima, média e adventícia de vasos arteriais ou venosos. A obtenção de um extrato que é essencialmente isento
15 dessas células indesejadas pode ser conseguida através de um jorro de água e lavagem cuidadosa do cordão umbilical antes da dissecação, seguida pela dissecação cuidadosa dos vasos dentro do cordão. Os vasos também podem ser removidos com cuidado do tecido do cordão circundante, em cujo caso o
20 tecido perivascular é removido com os vasos. Deve ser apreciado que, tomando cuidado para evitar a extração dessas células indesejadas, eles podem ainda estar presentes até uma extensão pequena no extrato resultante. Isto é aceitável, contanto que ocorram a uma freqüência demasiadamente
baixa para interferir nos resultados observados aqui apresentados, isto é, a
25 observação de colônias de células derivadas de origem mesenquimal e especificamente mesodermal, a freqüência e a rapidez da formação de CFU-F, CFU-O e CFU-A, e a caracterização dos fenótipos de HLA observados na população cultivada.

O tecido apoiado na zona perivascular é a geléia de Wharton proximal à parede externa da vasculatura umbilical, e ela se encontra tipicamente dentro de uma zona que se estende até cerca de 3 mm da parede externa dos vasos. De maneira adequada, a zona de extração alvo pode se encontrar dentro de cerca de 2 mm, por exemplo, cerca de 1 mm da parede externa de qualquer um dos três vasos. A extração de WJ dessa região pode ser obtida de imediato ao empregar a técnica descrita nos exemplos. Nessa técnica, os vasos são usados como um veículo para a WJ, e os vasos contendo geléia per se são usados como substrato do qual as células progenitoras são extraídas. Desse modo, nas realizações da invenção, Os vasos do cordão que contêm um revestimento fino tecido perivascular são excisados cirúrgica ou manualmente do cordão umbilical fresco que foi lavado completamente para remover essencialmente todos os contaminantes de sangue do cordão. Os vasos que apoiados sobre o tecido perivascular proximal são então incubados a cerca de 37°C em um meio de extração tal como solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo uma enzima apropriado para digerir a matriz de colágeno do tecido perivascular em que as células desejadas residem. Para essa finalidade, a digestão com uma colagenase é apropriada, a uma concentração dentro da faixa de cerca de 0,1 mg/ml a 1,0 mg/ml ou mais, por exemplo, 0,5 mg/ml. Durante a extração, as extremidades dos vasos são amarradas, ou grampeadas, e podem ser suspensas acima do meio de extração para evitar a contaminação pelos agentes contidos dentro do vaso. Desse modo, deve ser apreciado que o presente extrato de geléia de Wharton é essencialmente isento de células de sangue do cordão e de células endoteliais do vaso.

De acordo com a presente invenção, tal tecido é congelado e armazenado de preferência criogenicamente, e recuperado a partir do estado congelado ou criogênico de forma que permita a extração de células

progenitoras HUCPV viáveis a partir do tecido armazenado.

Outras enzimas digestivas que podem ser utilizadas no processo de isolamento são 0,1 a 10 mg/ml de hialuronidase, de 0,05 a 10 mg/ml de tripsina, bem como EDTA. A concentração ótima de colagenase é de 4mg/ml para a digestão por um período de 3 horas, apesar de ser uma alternativa menos dispendiosa seja a utilização de 0,5mg/ml por 18-24 horas. Ainda, outras alternativas para as concentrações de colagenase são ilustradas na Figura 21. Desejavelmente, a digestão é interrompida no momento ou antes de começar a degradar os vasos que, como mostra a Figura 21, ocorre em diversos pontos em função do tempo e concentração da colagenase.

Depois de cerca de 24 horas em 0,5 mg/mL de meio de extração, por exemplo, 12 a 36 horas, tais como 18 a 24 horas, ou após 3 horas em 4,0 mg/mL de meio de extração colagenase, os vasos são removidos, restando um extrato de tecido perivascular que contém células progenitoras humanas. Essas células são expandidas sob condições padrão para a expansão das células progenitoras. As células podem, por exemplo, ser selecionadas em poliestireno para selecionar para células aderentes, tais como lâminas ou frascos de poliestireno, e então ser mantidas em um meio de cultura apropriado. Em uma realização da invenção, as células extraídas são cultivadas para a expansão, com ou sem a seleção prévia para células aderentes, sob condições de suspensão agitada, tal como descrito, por exemplo, por Baksh *et al.* no pedido de patente WO 02/086104, cuja citação é aqui incorporada a título de referência.

A população de HUCPVCs extraídas pode ser cultivada sob condições aderentes, e células residentes não-aderentes são recuperadas do sobrenadante para um cultivo adicional. Estas células "pós-aderentes" são caracterizadas como uma subpopulação propensa a formar células de gordura e nódulos ósseos espontaneamente. Assim, o procedimento fornece uma

população de células progenitoras isoladas extraídas do tecido perivascular, as células que tenham a propensão para a constituição de pelo menos um dos vários tipos de células diferenciadas, incluindo células de osso, cartilagem, células de gordura e células musculares, onde essas células progenitoras constituem a fração não-aderente das HUCPVCs cultivadas sob condições aderente. Estas células são obtidas através da cultura de HUCPVCs extraídas de tecidos perivasculares sob condições aderentes, selecionando a população de células não-aderentes e, em seguida, cultivando a população de células não-aderentes em condições úteis para (1) ampliar a dita população ou (2) causar diferenciação desta em uma célula de fenótipo desejado. Condições úteis de cultura são aquelas já estabelecidas para essa expansão e diferenciação, como exemplificadas no presente.

As subpopulações de HUCPV podem ser expandidas sob condições de cultura aderente padrão. Como é revelado no presente, tais populações de células aderentes são conhecidas por incluírem progenitores imuno-incompetentes ou não-imunogênicos, e progenitores mesenquimais.

As células presentes no extrato poderão, quer diretamente, quer após a sua expansão, serem classificadas usando técnicas estabelecidas para fornecer subpopulações expansíveis enriquecida por células de um determinado fenótipo. Assim, é adicionalmente fornecido populações de células extraídas de tecido perivascular que são enriquecidas por células progenitoras mesenquimais multipotentes, células osteoprogenitoras, populações de células que são enriquecidos por células progenitoras imuno-incompetentes, e populações de células que são enriquecidos por células osteoprogenitoras e multipotentes que são imuno-incompetentes. Além disso, as células podem ser enriquecidas para selecionar apenas para aquelas que são positivas para o marcador de pericito 3G5, utilizando anticorpos do mesmo, e para selecionar apenas aquelas que são negativas para qualquer um ou ambos os marcadores

MHC Classe I e Classe II. A população celular também pode ser enriquecida pela seleção contra outros marcadores de superfície, tais como aqueles que ostentam a depleção de CD45 para remover células hematopoiéticas, por exemplo.

5 Tal como indicado na Figura 17, foi verificado que a distribuição de marcadores de MHC dentro da população de células progenitoras é alterada através de congelamento-descongelamento. Com a passagem de células frescas, a frequência de células de MHC negativo duplo é relativamente constante/marginalmente aumentada. No entanto, foi verificado, tal como
10 observado nos exemplos neste caso, que a frequência de células de MHC negativo duplo na população de células progenitoras é aumentada significativamente nas células em placa depois do congelamento. Desse modo, na presente população de células progenitoras, as células de fenótipo MHC negativo duplo também são caracterizadas pela propensão de aumentar na
15 frequência depois do congelamento. Tal congelamento é executado de maneira usual, ao preparar em primeiro lugar uma alíquota da célula, e então o preparado da célula é armazenado pelo período desejado. Deve ser apreciado que tais células podem ser armazenadas por muitos anos caso isto seja desejado.

20 Em uma realização, a presente invenção apresenta desse modo um método para a produção de células progenitoras de MHC negativo duplo, através da obtenção de um extrato de tecido perivascular tal como aqui descrito, ou uma fração do mesmo, enriquecida com MHC negativo duplo, da sujeição do extrato ou da fração do mesmo ao congelamento, e então o cultivo
25 das células congeladas. As células resultantes tal como observado são potencialmente úteis para induzir a formação ou o reparo de tecido em indivíduos humanos.

As populações de células obtidas do extrato, ou de uma fração

apropriadamente enriquecida do mesmo, são úteis tanto diretamente quanto depois de sua expansão para formar populações de células diferenciadas. Todos os procedimentos apropriados para o seu fracionamento e enriquecimento, e para a sua expansão, são estabelecidos na técnica anterior.

5 A expansão pode prosseguir, por exemplo, na presença de fatores tais como IL-3 e o Fator de Célula Tronco, e agentes similares conhecidos no estado da técnica. Em uma realização, a presente população de células, e em particular as células osteoprogenitoras na mesma, são sujeitadas à diferenciação ao
empregar as condições estabelecidas para o crescimento de tecido de osso a
10 partir das mesmas. De modo marcante, uma sub-população de células osteoprogenitoras que resultam do cultivo da presente população de células progenitoras, indicadas como osteoprogenitores consignados, mostrou a capacidade de se diferenciar na ausência de suplementos osteogênicos. Alternativamente, as células osteoprogenitoras são cultivadas em um meio
15 suplementado com um ou mais agentes que estimulam a osteogênese, tal como o dexametasona. Além disso, as células progenitoras também podem ser cultivadas com suplementos apropriados para estimular a diferenciação em outros tecidos ligados de forma mesenquimal (Caplan, 1991), incluindo a cartilagem, o músculo, o tendão, tecido adiposo, etc., tudo de acordo com a
20 prática padrão no estado da técnica.

Como uma alternativa prática para o cultivo *in vitro* de células na presente população de células, deve ser apreciado que, as células podem ser transplantadas *in vivo* para induzir a formação de um tecido desejado diretamente dentro de um paciente. Por essa rota, a formação do osso *in situ* é
25 obtida pelo implante de osteoprogenitor, para o benefício dos pacientes que sofrem de várias condições, doenças e distúrbios ósseos, em particular incluindo a fratura do osso e a osteoporose. As células progenitoras imuno-incompetentes presentes na população de células são particularmente valiosas

a este respeito, dada a resposta de rejeição substancialmente reduzida que se pode esperar depois de seu implante.

Para a utilização em transplantes, as células podem ser fornecidas como uma composição, ainda que inclua um veículo útil para a sua entrega ao local do tecido selecionado para o planejamento. As células são apresentadas em uma dose eficaz para o efeito pretendido. Espera-se que uma dose eficaz de célula estará na faixa de 10^3 a 10^7 células, por exemplo, 10^4 - 10^6 , tal como 2×10^5 células, por dose. O veículo selecionado para a entrega dessas células pode variar na composição, de acordo com procedimentos estabelecidos para a entrega de células viáveis. Em exemplos de realizações, as células são exploradas para fins de engenharia de tecido ósseo. Em uma realização, as células são apresentadas com um veículo, sob a forma de um arcabouço material que serve para localizar as células como um implante ósseo em um local que está defeituoso ou fraturado, ou seja, cirurgicamente preparado para receber o implante. Uma variedade de materiais adequados como veículo para este fim. Em uma determinada realização, o transportador é formado por materiais reabsorvíveis, tais como fosfato de cálcio, PLGA ou suas destes. Materiais equivalentes podem ser utilizados, desde que permitam que as células permaneçam viáveis durante a formação e a entrega da composição, e que sejam fisiologicamente compatíveis em outro local do implante.

Ainda outros veículos adequados para a entrega de células progenitoras irá incluir veículos, tais como PBS e géis incluindo o ácido hialurônico, gelatina e similares com equivalentes úteis, desde que possuam o pH e outras propriedades necessárias para a viabilidade celular.

Também será apreciado que as células são úteis como hospedeiras para a entrega de produtos da expressão genética ao local do tecido desejado. Isto é, as células podem ser geneticamente manipuladas para

receber e expressar os genes que após o rendimento dos produtos de expressão úteis no processo de reparar o tecido, tais como vários fatores de crescimento que, no caso do tecido ósseo, pode utilmente incluir PTH, BMPs, calcitonina, e similares. As células também podem ser desenvolvidas como transgênicas para outros fins, tais como a introdução de genes que alteram o fenótipo das células, para se tornarem mais robusta, ou mais adequada para uma determinada utilização final.

As realizações da invenção são descritas nos exemplos a seguir.

EXEMPLOS

10 COLETA DE CÉLULAS PROGENITORAS DE GELÉIA DE WHARTON HUMANA

Os UCs foram coletados de bebês da seção cesariana de termo completo imediatamente ao parto no *Sunnybrook & Women's College Hospital*, Toronto, Canadá. O UC foi transferido pelo cirurgião para uma vaso estéril que continha um meio (80% de α -MEM, 20% de antibiótico), e transportado imediatamente ao laboratório no Instituto de Biomateriais e Engenharia Biomédica da Universidade de Toronto.

Todos os procedimentos a partir desse ponto foram executados assepticamente em uma cabina de segurança biológica. O UC foi lavado em Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) (-Mg²⁺, -Ca²⁺) três vezes remover tanto sangue do UC quanto possível, e transferido de volta para um recipiente com um meio. Um pedaço de cerca de 6 cm do cordão foi cortado com uma tesoura estéril e colocado em uma placa de dissecação de cortiça estéril. O cordão restante (30 a 45 cm) foi retornado ao recipiente contendo o meio e colocado em uma incubadora a 37°C. A seção de 6 cm do cordão foi 'torcida' contra a sua hélice, e presa em ambas as extremidades para revelar uma superfície lisa e reta do epitélio do UC. Ao usar uma tesoura fina, o UC foi cortado até cerca de 1 a 2 mm de profundidade ao longo de seu comprimento para revelar a WJ. Começando com cada 'aleta' do epitélio cortado, a WJ foi

puxada de sua superfície interna ao usar o gume sem corte de um bisturi, e o epitélio puxado (cerca de 0,5 mm de espessura) foi fixado. Esse procedimento resultou na exposição da WJ, e com seus três vasos nela embutidos seguindo em linha reta de uma extremidade à outra extremidade e não helicoidalmente ao longo de seu eixo longitudinal. Foi tomado cuidado para banhar constantemente a seção com PBS a 37°C. Foi isolada uma das extremidades de um vaso com pinças, a qual foi puxada da WJ ao longo de seu comprimento até ficar livre da massa da matriz de WJ. Alternativamente, o meio do vaso podia ser dissecado da matriz, preso com pinças, e ser puxado da matriz em cada direção rumo às suas extremidades. Uma vez livre por um ou outro método, o vaso foi circundado com cerca de 1 a 2 mm da matriz da WJ contendo células. O vaso dissecado foi então preso em ambas as extremidades com um prendedor cirúrgico, um prendedor delgado ou suturado para criar um 'laço', bloqueando a passagem do fluido para dentro ou para fora do vaso. O 'laço' foi colocado imediatamente junto com a tesoura em um tubo de 15 ml contendo uma solução a 0,5 mg/ml de colagenase com PBS (- Mg²⁺, -Ca²⁺), e colocado em uma incubadora a 37°C. Os dois vasos restantes foram dissecados de uma forma similar, com a formação de laço, e também colocados na solução de colagenase na incubadora. Subseqüente à remoção dos vasos, tiras de WJ, constituindo tecido perivascular, podiam ser facilmente dissecadas do epitélio e ser colocadas em tubos de 50 ml com a solução de colagenase. A camada epitelial restante foi então descartada em um recipiente de resíduos biodegradáveis. O mesmo protocolo foi usado com os 30 a 45 cm restantes de UC, produzindo de 15 a 25 tubos com 'laços' ou tiras de tecido perivascular.

INICIAÇÃO DAS CULTURAS DE CÉLULAS PROGENITORAS DE GELÉIA DE WHARTON

Depois de 18 a 24 horas, as alças (*loops*) foram removidas com a ajuda de seu prendedor de suspensão fixado ou sutura e uma pipeta, e as

suspensões restantes foram então diluídas de 2 a 5 vezes com PBS e centrifugadas a 1150 rpm por 5 minutos para obter a fração celular como um pellet no fundo do tubo. Após a remoção do sobrenadante, as células foram novamente suspensas em oito vezes o volume de NH₄Cl 4% por 5 minutos a temperatura ambiente, a fim de lisar qualquer contaminante das células vermelhas. As suspensões foram então novamente centrifugadas a 1150 rpm por 5 minutos para isolar a fração celular como um pellet, e o sobrenadante foi removido. Após a contagem das células com o uso de hemocítômetro, as mesmas foram colocadas diretamente em placas de poliestireno de cultura de tecido T-75 cm², e mantidas incubadas a 37°C por 24 a 72 horas a fim de permitir que as células se unissem à superfície de poliestireno. O meio foi então trocado a cada dois dias.

Os resultados detalhados abaixo foram reproduzidos a partir do uso do procedimento descrito acima, mas em que a digestão com base em colagenase foi realizada a 4 mg/ml por 3 horas, 2 mg/ml por 6 horas e 1 mg/ml por 12 horas.

As células unidas foram passadas ao usar uma solução de tripsina a 0,1% depois de sete 7 dias, quando então exibiram uma confluência de 80 a 90%, tal como observado através de microscopia luminosa, e havia evidências da formação de agregados “mineralizados”, tal como revelado sob microscopia de fase e indicado por mudanças previstas nas propriedades ópticas. Com a passagem, as células foram colocadas em placas de poliestireno de cultura de tecido de 35 mm ou placas de 6 cavidades a 4×10^3 células/cm² meio suplementado (SM) (75% de α -MEM ou D-MEM, 15% de FBS, 10% de antibiótico), e tratadas com os 10^{-8} M de Dex, 5 mM de β -GP e 50 μ g/ml de ácido ascórbico, para testar a capacidade osteogênica dessas células. Essas placas foram observadas nos dias 2, 3, 4 e 5 da cultura quanto a CFU-O, também indicada como a “formação do nódulo ósseo”.

A fim de testar a capacidade condrogênica destas células, 2×10^5 de células foram centrifugadas a 1150 rpm por 5 minutos, a fim de se obter as células como um pellet. Uma vez que o sobrenadante foi removido, as células foram mantidas em meio suplementado (SM) suplementado com 10 ng/ml de fator β de crescimento transformante (TGF- β) (e opcionalmente com 10^{-7} M de dexametasona). O meio suplementado foi trocado a cada dois dias, mantendo as culturas por 3 a 5 semanas, sendo que neste ponto as células foram coletadas para histologia (através de fixação com 10% de formol tamponado neutro (NFB)), emblocado em parafina, cortadas em seções de 6 μ m, e marcados para a presença de colágeno II (marcação por anticorpo) e para a presença de glicosaminoglicanos (corado com *Alcian Blue*). Para se determinar a capacidade de diferenciação adipogênica destas células, elas foram inicialmente cultivadas em placas de 6 cavidades em SM (com D-MEM), que foi substituído a cada 2 dias, até que fosse alcançada 60% de confluência. Neste momento, o meio foi substituído por um meio de indução adipogênica (AIM) (88% de D-MEM, 3% de FBS, 33 μ M de biotina, 17 μ M de pantotenato, 5 μ M de *PPAR-gama*, 100 nM de insulina bovina, 1 μ M de dexametasona, 200 μ M de isobutil metilxantina e 10% de antibióticos). O meio AIM foi substituído a cada 2 dias, durante 10 dias, momento em que as células foram fixadas em 10% de NFB e coradas com *Oil Red O*, que marca os vacúolos lipídicos dos adipócitos em vermelho. Finalmente, a fim de se determinar a capacidade miogênica das células, elas foram inicialmente cultivadas em frascos T-75 cm^2 de cultura de tecido em SM (com D-MEM), até que fosse alcançada de 80 a 90% de confluência, momento em que o meio foi substituído por meio miogênico (MM) (75% de D-MEM, 10% de FBS, 10% de soro de cavalo, 50 μ M de hidrocortisona e 10% de antibióticos). O meio MM foi substituído a cada 2 dias. Após 3 a 5 semanas em cultura, as células foram removidas da superfície de cultura (vide protocolo de sub-cultivo), lisadas a fim de se obter o seu

mRNA, e determinadas, através de RT-PCR, para a presença de diversos genes miogênicos, incluindo: MyoG, MyoDI, Myf5, cadeia pesada de miosina, miogenina e desmina.

5 Outra abordagem útil para a obtenção das culturas de células progenitoras derivadas de tecido perivascular foi adotada, ao empregar o seguinte protocolo:

1. Obter o cordão umbilical (UC) estéril da paciente de cessão de cesariana e transportar o mesmo para a cabine de segurança biológica, em um meio (80% de α -MEM, 20% de antibiótico).

10 2. Lavar o UC três vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril a 37°C.

3. Cortar o UC em seções de cerca de 1 a 2 polegadas com uma tesoura afiada.

15 4. Lavar cada seção do UC duas vezes em PBS estéril a 37°C para remover tanto sangue residual do cordão umbilical (UCB) quanto possível.

5. Isolar uma das seções do UC em uma placa estéril seca.

6. Ao usar dois jogos de *fórceps*, prender o epitélio a cerca de 2 mm separados, e afastar um do outro, rasgando o epitélio.

20 7. Prender o epitélio ao longo do comprimento da seção do UC, continuar a cortar o epitélio, expondo a WJ em baixo.

8. De forma similar à etapa 6, continuar a rasgar o epitélio em “tiras”, até que cerca da metade do epitélio fique separada pelo rasgo.

9. Os vasos umbilicais devem ficar claramente visíveis através da WJ, e das extremidades frouxas nas bordas cortadas da seção do UC.

25 10. Prender um pedaço restante do epitélio com um jogo de *fórceps*, e a extremidade de um vaso com o outro, e o vaso pode ser “puxado” da massa de WJ com seu tecido perivascular circundante (PVT).

11. Esse processo é repetido com cada vaso, até que todos os

três estejam livres da matriz de WJ subjacente.

12. Uma vez liberado, cada vaso é colocado em PBS a 37°C.

13. As etapas 5 a 12 são repetidas com cada seção de UC até que todos os vasos estejam isolados em um béquer contendo PBS estéril a
5 37°C.

14. Em seguida, colocando cada vaso individualmente em uma superfície limpa e estéril, as extremidades podem ser unidas com uma sutura, utilizando um nó duplo como uma "alça".

15. Uma vez todos os vasos estejam unidos em alças, as alças são colocadas em uma solução de 0,5 mg/ml de colagenase em um tubo estéril de 50 ml. Em uma alternativa, e de acordo com a presente invenção, os vasos podem ser congelados, armazenados de forma criogênica e então restaurados, mantendo a viabilidade do progenitor residente (HUCPVCs), utilizando o método aqui descrito, e os progenitores viáveis presentes tecido de cordão tratado e descongelado podem ser recuperados utilizando um método que se inicia na etapa 15.

16. O tubo de 50 ml é colocado em um aparelho rotativo em uma incubadora com 5% de CO₂ a 37°C durante toda a noite.

17. No dia seguinte, a colagenase é desativada com 1 ml de soro bovino fetal (FBS), e as alças são removidas da suspensão.
20

18. A suspensão restante é diluída com o PBS, centrifugada a 1150 rpm por cinco minutos, e o sobrenadante é removido.

19. O pellet é então novamente suspenso em 8 vezes o volume de 4% de NH₄Cl por 5 minutos a temperatura ambiente, para lisar todas as células vermelhas do sangue contaminantes, e então centrifugado a 1150 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante removido.
25

20. As células restantes no pellet são então novamente suspensas em meio suplementado (SM) (75% de α -MEM, 15% de FBS, 20%

de antibiótico), e a alíquota é contada em um hemocitômetro.

21. A suspensão das células é então colocada em um frasco de poliestireno de cultura de tecido T-75, e colocada para proliferar.

22. Após dois dias, o sobrenadante do frasco é transferido para um novo frasco T-75, a fim de se coletar as células pós aderentes" (PA).

23. Após dois dias, o sobrenadante do primeiro frasco PA é transferido para um novo frasco T-75, a fim de se coletar quaisquer células PA remanescentes.

24. O SM é substituído em todos os três frascos T-75, a cada dois dias, até que as células alcancem a sub-confluência (uma a duas semanas), quando então elas são sub-cultivadas (passadas).

CRIOPRESERVAÇÃO DE TODOS OS VASOS DO CORSO UMBILICAL

A presente invenção permite o retorno de células viáveis a partir de tecido de cordão armazenado criogenicamente, utilizando o seguinte procedimento exemplificado.

CONGELAMENTO

Vasos de cordão umbilical individuais foram isolados conforme descrito acima, e as extremidades foram retiradas com suturas em forma de alça, conforme descrito acima. Os vasos foram colocados em tubos de polipropileno de 15 mL contendo, cada um, 5 ml do meio de criopreservação, que consiste em 90% de soro bovino fetal (FBS) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Os tubos preparados foram então colocados em um freezer a -70°C por uma noite, e foram transferidos no dia seguinte para nitrogênio líquido, por um longo período de armazenamento.

DESCONGELAMENTO

Um tubo contendo o espécime preparado foi removido do nitrogênio líquido após 3 dias de armazenagem, e colocado imediatamente em um banho Maria a 37°C . Uma vez completamente descongelado,

aproximadamente 5 minutos, as alças do espécime foram colocadas em um meio de digestão de colagenase, conforme descrito acima, e colocado em um suporte giratório em uma estufa a 37°C. Após 18 a 24 horas de incubação, os vasos digeridos foram removidos, e as células progenitoras foram isoladas utilizando o procedimento descrito acima. Após serem colocadas em placas de cultura de tecido e cultivadas em 5 a 15% de meio suplementado com FBS, também conforme descrito acima, as células viáveis foram identificadas a partir de exclusão de tripano.

Um método aprimorado foi ainda desenvolvido, conforme descrito a seguir. Os vasos com a geléia de Wharton associada foram removidos do cordão e seccionados em segmentos de cerca de 1 a 2 polegadas, ou cerca de 4 cm de comprimento, utilizando as técnicas conforme descritas acima. Os segmentos de vasos removidos (cerca de 5 a 10 segmentos por tubo, para evitar a aglomeração) foram então colocados em 10% de DMSO e 90% de FBS (resfriado a 4°C) em um tubo de centrífuga de 50 mL, sendo 1 mL por vaso. No lugar de 90% de FBS, diferentes misturas ou combinações contendo soro podem ser utilizadas, tal como 10% de soro (FBS ou outro) e 80% de DMEM, ou outro meio apropriado para o cultivo celular. Os tubos contendo os segmentos de vasos em uma solução de DMSO/soro foram então resfriados de forma transitória, primeiramente incubando por 30 minutos em uma geladeira a 4°C. Os tubos foram então removidos, e os vasos foram transferidos para recipientes de criopreservação, conhecidos como criotubos. Um segmento de vaso foi adicionado em cada tubo. Aos criotubos contendo os vasos, foram adicionados 1 mL de solução criopreservante (90% de soro, 10% de DMSO, conforme descrito acima) por 4 cm de seção do vaso, ou tempo suficiente para submergir o vaso de forma completa.

Os segmentos de vasos colocados no criotubo foram colocados em uma taxa de congelamento controlada durante uma noite (cerca de 6 a 12

horas), reduzindo e mantendo a temperatura para cerca de -70°C . Desde então, os tubos foram transferidos para o armazenamento em nitrogênio líquido (fase de vapor), marcados para identificação, e mantendo a -196°C , por cerca de uma semana.

5 Para descongelar os vasos, os criotubos foram removidos do armazenamento em nitrogênio líquido. Os vasos foram removidos dos criotubos, e deixados descongelar por 10 minutos em banho Maria 37°C . Os segmentos de vaso foram então transferidos para tubos de 50 mL, e lavados em PBS resfriado (4°C), utilizando cerca de 1 mL de PBS por segmento de
10 vaso. Os tubos com os segmentos de vasos no PBS foram então incubados em uma geladeira a 4°C , para remover o DMSO. A quantidade de PBS resfriado em cada tubo foi então dobrada, e os tubos foram incubados por 5 minutos adicionais na geladeira.

 Seguindo este procedimento, os segmentos de vasos estão
15 prontos para servir de fonte de células progenitoras viáveis, incluindo HUCPVCs, particularmente de acordo com as técnicas de extração, cultura e diferenciação de célula progenitora descritas adicionalmente no presente.

 Para confirmar que células viáveis são recuperáveis do tecido preservado desta forma, os segmentos de vasos foram submetidos ao
20 procedimento de digestão descrito acima, as células liberadas foram colocadas em placas, conforme descrito com referência à figura 22, e as células foram contadas em uma máquina ViCell-XR, utilizando exclusão por azul de tripano. Seguindo este procedimento, as células determinadas como sendo viáveis foram colocadas em placas em meios de cultura padrão, conforme mencionado
25 no presente, sendo então demonstrada sua habilidade para formar colônias e proliferar, conforme exibido nos painéis A e B da Figura.

 Este método resultou em células que são bioequivalentes às células que são removidas a partir do procedimento de digestão padrão.

Outros métodos foram testados, incluindo imersão dos tecidos dissecados em 10% de DMSO, sendo então realizada a etapa de congelamento a -70°C , seguida de criopreservação. Estes métodos resultaram em pouquíssimas células viáveis, conforme ilustrado no painel C da figura 22.

5

ENSAIOS DE PROGENITOR

ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Durante o procedimento de passagem semanal (que ocorre a cada seis dias), alíquotas de 3×10^4 células foram colocadas em cada cavidade de 24 placas de poliestireno de cultura de tecido de 6 cavidades. Nos dias 1, 2, 3, 4, 5 e 6 da cultura, quatro das placas de 6 cavidades foram passadas e as células foram contadas. A expansão exponencial dessas células foi plotada, e o momento de duplicação médio para as células nessas culturas foi calculado. Os resultados são mostrados na Figura 16. Deve ser observado que o momento de duplicação para a cultura de células PVWJ é de cerca de 24 horas através de todo o período de cultivo. Durante a fase de crescimento logarítmico, o tempo de duplicação é marcante de 16 horas. Isto se compara com os tempos de duplicação relatados na literatura, de cerca de 33 a 36 horas para células do mesênquima de medula óssea (Conget and Minguell, 1999), e cerca de 3,2 dias para células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (Sem et al., 2001). Para a observação da proliferação com passagens sucessivas, 3×10^5 células foram colocadas em quatro frascos T-75, e alimentadas com SM que foi substituído a cada dois dias. Após 6 dias de cultura as células foram subcultivadas (vide o protocolo de subcultivo acima), e contadas com o uso de um hemocitômetro. Alíquotas de 3×10^5 células foram semeadas em quatro novos frascos T-75, cultivadas por 6 dias, e então o processo de contagem foi repetido. Este processo foi repedido de P0 a P9 para 4 amostras de cordão.

A figura 18 ilustra a frequência CFU-F de HUCPVCs. A frequência

de 1:300 é significativamente maior daquela observada para outras fontes de progenitor mesenquimal, incluindo BM neonatal (1:10⁴) (Caplan, 1991), e “células tronco somáticas não restritas” derivadas de sangue de cordão umbilical (USSCs) (Kogler et al., 2004) que ocorre a uma frequência de 1:2 x 10⁸. A figura 19 ilustra a taxa de proliferação de HUCPVCs com passagens sucessivas. O tempo de duplicação inicial de 60 horas a P0 diminui para 38 horas a P1, que diminui e mantém a mesma por 20 horas de P2 a P8. As células começam a entrar, a seguir, na senescência e suas taxas de proliferação começam a diminuir rapidamente. De forma interessante, quando observadas durante os primeiros 30 dias de cultura (figura 20), HUCPVCs derivam 2 x 10¹⁰ células em 30 dias. Como uma dose terapêutica (TD) é definida como 2 x 10⁵ células (Horwitz et al, 1999) (Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M et al. *Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta*. Nat Med 1999; 5:309-313.), as HUCPVCs podem derivar 1 TD a cada 10 dias de cultivo, e 1000 TDs em 24 dias de cultivo.

Tal como mostrado na Figura 15, os progenitores derivados de tecido perivascular compreendem sub-populações diferentes de células progenitoras. Dentro dessa população, há as chamadas células osteoprogenitoras “consignadas”, caracterizadas por uma capacidade de formar nódulos ósseos, tal como demonstrado no presente, na ausência dos suplementos de cultura normalmente necessários para induzir tal diferenciação, tal como a cultura na presença de dexametasona. Esses osteoprogenitores consignados diferenciam-se desse modo espontaneamente para formar os nódulos ósseos. Também dentro da população de progenitores são encontradas as células osteogênicas que podem ser induzidas para formar os nódulos ósseos, quando cultivadas na presença dos fatores necessários, tais como a dexametasona, o β-glicerofosfato e o ácido ascórbico. Desse modo, a

sub-população "osteogênica total" representada graficamente na Figura 15 inclui a população de "progenitores osteogênicos consignados", bem como uma população de "progenitores osteogênicos não consignados", e revela o número total das células que podem ser induzidas a se diferenciar conforme a via de diferenciação osteogênica. A razão real entre a população "consignada" e "não consignada" é de cerca de 1:1 e, desse modo, a razão entre a população de "progenitor osteogênico total" e a população de "progenitor osteogênico consignado" é de cerca de 2:1. A análise das propriedades de formação de osso dos progenitores foi realizada conforme observado a seguir.

A diferenciação condrogênica, adipogênica e miogênica das células foi também observadas. Embora diferenciações osteogênica e adipogênica ocasionais fossem observadas espontaneamente, os outros fenótipos foram apenas observados quando realizado o cultivo sob condições de indução específicas para o fenótipo respectivo.

DILUIÇÃO EM SÉRIE E ENSAIOS CFU-F

Diluições de 1×10^5 , 5×10^4 , $2,5 \times 10^4$, 1×10^4 , 5×10^3 , 1×10^3 HUCPVCs foram semeadas em placas de cultura de tecido de 6 cavidades (Falcon# 353046) e alimentadas a cada dois dias com SM. O número de colônias, compreendendo mais de 16 células foi contado em cada cavidade no décimo dia de cultivo, e confirmado no décimo quarto dia de cultivo. A frequência CFU-F, o número médio de células necessárias para produzir uma colônia, foi conseqüentemente determinado como sendo 1 CFU-F/300 HUCPVCs colocados na placa. Com base nesta frequência, o volume de unidade necessário para fornecer 300 HUCPVCs (feito em triplicata de cada 3 cordões) foi calculado, e o volume de unidades adicionais de HUCPVCs foram semeados em cavidades individuais de placas de 6 cavidades. Novamente, colônias com mais de 16 células (CFU-Fs) foram contadas no décimo dia de cultivo para se determinar a frequência CFU-F com semeadura adicional.

ENSAIO CFU-O

Durante o procedimento de passagem semanal, as alíquotas de populações de células de teste foram colocadas diretamente nas placas de poliestireno de cultura de tecido em um meio de formação de osso contendo 5 75% de α -MEM, 15% de FBS (coleção de células tronco #: S13B40), 10% de solução de partida de antibiótico contendo penicilina G (167 unidades/ml), gentamicina (50 μ g/ml) e anfotericina B (0,3 μ g/ml), e Dex (10^{-8} M), β -glicerofosfato (5 mM) e ácido L-ascórbico (50 μ g/ml), a uma densidade de 10 semeadura de células de 1×10^4 células/cm². As culturas foram novamente alimentadas a cada dois dias por um período de doze dias. As culturas foram mantidas até serem observadas áreas nodulares mineralizadas, detectadas como nódulos ósseos (normalmente três dias), quando então as culturas foram novamente alimentadas com um meio contendo tetraciclina na última cultura re-alimentada, e a seguir fixadas em um fixador de Karnovsky e preparadas 15 para a análise. Um microscópio Leitz Aristoplan (Esselte Leitz GmbH & Co KG, Stuttgart, Alemanha) foi utilizado para visualizar as culturas marcadas com tetraciclina sob contraste de fase, bem como fluorescência UV, e um microscópio eletrônico de varredura Hitachi S-2000 a uma voltagem de aceleração de 15 kV foi utilizado gerar imagens para demonstrar a presença da 20 matriz óssea morfológicamente identificável.

ENSAIO CFU-C

A fim de testar a capacidade condrogênica destas células, 2×10^5 células foram centrifugadas a 1150 rpm por 5 minutos para se obter as células como um pellet. Uma vez que o sobrenadante é removido, as células foram 25 mantidas em SM suplementado com 10 ng/ml de fator β de crescimento transformante (TGF-P) (e opcionalmente com 10^{-7} M de dexametasona). O meio suplementado foi substituído a cada dois dias, mantendo as culturas por 3 a 5 semanas, momento em que são coletadas para histologia (por fixação com

10% de tampão de formalina neutro (NFB)), embebidas em parafina, cortadas em seções de 6 µm, e marcadas para a presença de colágeno II (marcação com anticorpo), e a presença de glicosaminoglicanos (corado por *alcian blue*). As marcas confirmam a formação de condrócitos sob condições de indução.

5

ENSAIO CFU-A

Para se determinar a capacidade de diferenciação adipogênica destas células, elas foram inicialmente cultivadas em placas de 6 cavidades em SM (com D-MEM), que foi substituído a cada 2 dias, até que fossem alcançados 60% de confluência. Neste momento, o meio foi substituído por meio de indução adipogênica (AIM) (88% de D-MEM, 3% de FBS, 33 µM de Biotina, 17 µM de Pantotenato, 5 µM de PPAR-gama, 100 nM de insulina bovina, 1 µM de Dexametasona, 200 µM de isobutil metilxantina e 10% de antibióticos). O meio AIM foi substituído a cada 2 dias por 10 dias, quando então as células foram fixadas em 10% de NFB e coradas com "Oil Red O" que cora de vermelho os vacúolos de lipídeos de adipócitos. A coloração confirmou a formação de adipócitos, não apenas sob condições de indução, mas também na sua ausência, ou seja, espontaneamente.

10

15

ENSAIO CFU-M

Para se determinar a capacidade miogênica das células, elas foram inicialmente cultivadas em frascos de cultura de tecido T de 75 cm² em SM (com D-MEM), até que fossem alcançados de 80 a 90% de confluência, quando então o meio foi substituído com meio miogênico (MM) (75% de D-MEM, 10% de FBS, 10% de soro de cavalo, 50 µM de hidrocortisona e 10% de antibióticos). O MM foi substituído a cada 2 dias. Após 3 a 5 semanas na cultura, as células foram removidas da superfície de cultivo (vide protocolo de subcultivo), lisadas para se obter seu mRNA, e determinadas através de RT PCR para a presença de diversos genes miogênicos incluindo: MyoG, MyoDI, Myf5, cadeia pesada de miosina, miogenina e desmina. Os resultados

20

25

confirmaram a presença de miócitos sob estas condições de indução.

ANÁLISE DOS DADOS

MARCA DE TETRACICLINA

5 Tetraciclina (9 µg/ml) foi adicionada às culturas antes da conclusão. Na conclusão, as células foram fixadas em fixador de Karnovsky durante toda a noite e então visualizadas pela imagem de fluorescência excitada com UV para a marcação com tetraciclina do componente mineral das áreas nodulares.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM)

10 As amostras representativas de culturas de CFU-O foram preparadas para SEM ao colocar, em primeiro lugar, as mesmas em 70%, 80%, 90% e 95% de etanol por uma hora, seguindo-se a imersão em etanol a 100% por três horas. Elas foram então secas ao ponto crítico. Uma camada de ouro de cerca de 3 nm foi colocada, através de um Sistema de Revestimento Polaron SC515 SEM sobre os espécimes, os quais foram então examinados a 15 várias ampliações em um microscópio eletrônico de varredura Hitachi S-2000 a uma voltagem de aceleração de 15 kV. As imagens geradas são usadas para demonstrar a presença da matriz óssea morfológicamente identificável.

CITOMETRIA DE FLUXO PARA TIPIIFICAÇÃO DE HLA

20 Populações das células de teste de mais de 1×10^5 células foram lavadas em PBS contendo 2% de FBS (Coleção de Células Tronco #: S13E40) e novamente suspensas em PBS + 2% FBS com concentrações de saturação (diluição de 1:100) do seguinte IgG1 de camundongo conjugado: HLA-A, B, C-PE e HLA-DR, DP, DQ-FITC por 30 minutos a 4°C. A suspensão das células foi 25 lavada duas vezes com PBS + 2% FBS, marcada com 1 µg/ml de 7-AAD (BD Biosciences) e novamente suspensa em PBS + 2% FBS para a análise em um citômetro de fluxo (XL, Beckman-Coulter, Miami, FL) ao usar o software ExpoADCXL4 (Beckman-Coulter). A marcação positiva foi definida como a

emissão de um sinal de fluorescência que excedeu os níveis obtidos por mais de 99% das células da população de controle marcada com os anticorpos de isotipos combinados (IgG1 de camundongo conjugado com FITC e PE, padrões de isotipos monoclonais κ , BD Biosciences). Para cada amostra, pelo menos 10.000 eventos do modo da lista foram coletados. Todas as plotagens foram geradas no software de Análise EXPO 32 CAD.

Além da tipagem HLA, a população de células HUCPV foi também determinada para outros marcadores, conforme resultados exibidos a seguir:

Marcador	Expressão
CD105 (SH2)	++
CD73 (SH3)	++
CD90 (Thy1)	++
CD44	++
CD117 (c-kit)	15% +
MHCI	75% +
MHCII	-
CD106 (VCAM1)	-
STRO1	-
CD123 (IL-3)	-
SSEA-4	-
Oct-4	-
HLA-G	-
CD34	-
CD235a (Glicoforina A)	-
CD45	-

RESULTADOS

10

MICROGRAFIAS LUMINOSAS DE COLÔNIAS DE NÓDULOS ÓSSEOS

As Figuras 3, 4 e 5 ilustram CFU-Os que estavam presentes nas culturas no dia 3 e no dia 5. Elas demonstraram a camada confluenta de

células "similares a fibroblastos" que circundam uma área nodular representada por uma "agregação" de células poligonais que estavam produzindo a matriz óssea. Esses CFU-Os foram observados nas culturas de Dex (+) e Dex (-), e exibiram uma morfologia similar após passagens sucessivas.

5 **MARCAÇÃO COM TETRACICLINA DE CULTURAS DE CFU-O**

A marcação com tetraciclina das culturas foi usada para marcar o fosfato de cálcio recém formado associado com a fase mineral biológica do osso. A marcação com tetraciclina das culturas coincide com as áreas nodulares mineralizadas, o que é visualizado ao expor as culturas à luz UV. As Figuras 6 e 7 mostram culturas de CUF-O marcadas com tetraciclina das culturas do dia 3 e do dia 5 de células progenitoras. Essas imagens foram geradas pela imagem de fluorescência excitada por UV, e fotografadas.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os CFU-Os foram observados sob SEM quanto à formação da matriz de colágeno mineralizada que demonstra a formação de CFU-Os a partir dos estágios iniciais da formação de colágeno até a matriz densamente mineralizada no CUF-O maduro. As Figuras 8, 9, 10, 11, 12 e 14 representam micrografias eletrônicas de varredura de CFU-Os.

CITOMETRIA DE FLUXO E TIPIFICAÇÃO DE HLA

A citometria de fluxo, identificando os antígenos da superfície da célula que representam ambos os Complexos de Histocompatibilidade Principais (MHCs) demonstrou que 77,4% da população das células são isoladas como MHC ^{-/-}. A Figura 13 ilustra os resultados da citometria de fluxo com relação ao controle negativo. A Figura 17 mostra o impacto de congelamento-descongelamento na frequência de células de MHC ^{-/-} na população de células progenitoras. O efeito de congelamento-descongelamento foi estudado tal como segue:

Populações de célula de teste de mais de 1×10^5 células foram

lavadas em PBS contendo 2% FBS e novamente suspensas em PBS + 2% FBS com concentrações de saturação (diluição de 1:100) do seguinte IgG1 de camundongo conjugado: HLA-A, B, C-PE (BD Biosciences # 555553, lote M076246) (MHC I), HLA-DR, DP, DQ-FITC (BD Biosciences # 555558, lote M074842) (MHC II) e CD45-Cy-Cychrome (BD Biosciences BD # 555484, lote 0000035746) por trinta minutos a 4°C. A suspensão das células foi lavada duas vezes com PBS + 2% FBS e novamente suspensa em PBS + 2% FBS para a análise em um citômetro de fluxo (XL, Beckman-Coulter, Miami, FL) ao usar o software ExpoADCXL4 (Beckman-Coulter). A marcação positiva foi definida como a emissão de um sinal de fluorescência que excedeu os níveis obtidos por mais de 99% das células da população controle marcadas com os anticorpos de isotipos combinados (IgG1 de camundongo conjugado com FITC, PE e citocromo-Cy, padrões de isotipos monoclonais κ , BD Biosciences), o que foi confirmado pela fluorescência positiva de amostras de BM humanas. Para cada amostra, pelo menos 10.000 eventos do modo da lista foram coletados. Todos os lotes foram gerados no software de Análise EXPO 32 CAD.

SUB-CULTURA E SEMEADURA DE CÉLULAS

As células unidas foram sub-cultivadas (passadas) ao usar uma solução a 0,1% de tripsina depois de sete dias, quando então elas exibiram de 80 a 90% de confluência, tal como observado por microscopia luminosa. Com a passagem, as células foram observadas através de citometria de fluxo para a expressão de MHC-A, B, C, MHC-DR, DP, DQ e CD45. Elas foram então colocadas em frascos de poliestireno de cultura de tecido T-75 a 4×10^3 células/cm² em SM, e tratadas com 10^{-8} M de Dex, 5 mM de β -GP e 50 μ g/ml de ácido ascórbico, para testar a capacidade osteogênica dessas células. Esses frascos foram observados nos dias 2, 3, 4, 5 e 6 de cultura quanto a CFU-O ou formação de nódulos ósseos. Todas as células residuais do procedimento de passagem também foram preservadas por criogenia para uso futuro.

PRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS POR CRIOGENIA

Alíquotas de 1×10^6 células PVT foram preparadas em um volume total de 1 ml que consiste em 90% de FBS, 10% de sulfóxido de dimetila (DMSO) (Sigma D-2650, lote # 11K2320), e pipetadas em frascos de
5 criogenia de polipropileno de 1 ml. Os frascos foram colocados em um freezer a -70°C durante toda a noite, e transferidos no dia seguinte para um freezer a -150°C para a armazenagem a longo prazo. Depois de uma semana de criopreservação, as células PVT foram descongeladas e observadas através de
10 citometria de fluxo para a expressão de MHC-A, B, C, MHC-DR, DP, DQ e CD45. Um segundo protocolo foi usado, no qual as células PVT foram descongeladas depois de uma semana da criopreservação, re-cultivadas por uma semana, sub-cultivadas e então re-analisadas através de citometria de fluxo para a expressão de MHC-A, B, C, MHC-DR, DP, DQ e CD45.

Os resultados são apresentados na Figura 17. Deve-se observar
15 que a freqüência de MHC $-/-$ dentro da população de células frescas é mantida através de diversas passagens. Quando as células frescas são congeladas depois da passagem, a -15°C por uma semana e então analisadas de imediato quanto ao fenótipo de MHC, essa população analisada indica uma freqüência
20 marcadamente ampliada das células de fenótipo de MHC $-/-$. Desse modo, as células do fenótipo de MHC $-/-$ podem ser enriquecidas de maneira útil a partir de uma população de células PVT através de congelamento. Ainda mais enriquecimento é obtido através da passagem das culturas das células previamente congeladas. Em particular, e conforme observado na figura 17, a
25 primeira passagem de células criopreservadas aumenta a população relativa de células MHC $-/-$ para mais de 50% e subsequente congelamento e passagem destas células gera uma população MHC $-/-$ de mais de 80%, 85%, 90% e 95%. As células PVT congeladas per se são potencialmente muito úteis na terapia humana, devido à sua natureza não imunogênica.

COLETA DA FRAÇÃO DE CÉLULAS HUCPV PÓS ADERENTE

O rendimento de progenitores recuperados do tecido perivascular pode ser amplificado da seguinte maneira. A fim de ser coletar a fração “pós aderente” (PA) de HUCPVSc, o sobrenadante da coleta de HUCPV semeado inicialmente foi colocado em um novo frasco T-75, e incubado a 37°C, 5% de CO₂ por 2 dias. O frasco de HUCPV inicialmente semeado foi então alimentado com SM fresco. Após dois dias, este sobrenadante foi novamente transferido para um novo frasco T-75, e as células unidas alimentadas com meio SM fresco. Finalmente, o sobrenadante do terceiro frasco semeado foi aspirado, e este frasco alimentado com SM fresco. (Conseqüentemente, para cada cordão, 3 frascos são gerados: o frasco alimentado inicialmente, a primeira fração PA, e a segunda fração PA). Características similares à idênticas destas células são comparadas visualmente com relação às células semeadas inicialmente, confirmando que altos rendimentos celulares são obtidos a partir do isolamento destas frações de PA. Similares a HUCPVCs semeadas inicialmente, estas células PA possuem uma taxa de proliferação rápida, produzem nódulos ósseos espontaneamente na cultura, e podem ser induzidas à diferenciação em outras três linhagens: cartilagem, gordura e músculo.

COMPOSIÇÕES DE TECIDO CONSTRUÍDOS CONTENDO CÉLULAS PROGENITORAS

Neste exemplo, as células são combinadas com um veículo na forma de CAP/PLGA comumente utilizado no campo de produção óssea. Para se alimentar os arcabouços CAP/PLGA, eles foram cortados em cilindros de 5 mm por 5 mm. Então, uma suspensão de 200 µl de 2×10^5 HUCPVCs foi colocada em um tubo *Eppendorf* estéril de 1,5 ml, e o arcabouço colocado na suspensão. Através do uso de uma pipeta de ponta modificada (com um diâmetro de sucção de 5 mm), a suspensão de células foi succionada e lavada através do arcabouço diversas vezes, a partir de pipetações. Estes arcabouços foram então encubados nesta suspensão por 4 horas a 37°C, 5% de CO₂, para

permitir a ligação das células no arcabouço. Após 4 horas, os arcabouços foram removidos das suspensões e colocados em paredes individuais de uma placa de 24 cavidades tratada não de cultura de tecido, alimentados com 1 ml de SM e incubados a 37°C, 5% de CO₂ por 14 dias, o meio SM sendo substituído a cada 2 dias. Os arcabouços foram então fixados em um fixador de Karnovsky e preparados para análise SEM (vide acima). Após 14 dias de cultura, as HUCPVCs cobriram completamente o arcabouço.

Conforme observado, a população de células progenitoras PVT pode também ser utilizada para gerar células mesenquimais e tecidos diferentes de osso, através do cultivo sob condições apropriadas para a mencionada diferenciação. Para gerar adipócitos, por exemplo, os progenitores são preparados a uma concentração de 10⁴ células/cm² e colocados em placas de cultura de tecido de 35 mm. As células são mantidas no Meio de Preadipócito (PM) (DMEM/F-10 de Ham (1:1, vol/vol), 10% de soro de vitelo fetal, 15 mM de HEPES, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 0,25 µg/ml de anfotericina B) por três dias. Depois de três dias, o PM é removido, e as células são alimentadas com meio adipogênico (DMEM/caldo nutriente F-10 de Ham, 1:1, v/v; Tampão de HEPES (15 mM); Soro bovino fetal (3%); Biotina (33 µM), Pantotenato (17 µM), insulina humana (100 nM), dexametasona (0,5 µM), agonista de PPAR γ (1 µM) e antibióticos), e cultivadas por três dias. Após a indução de três dias, o meio adipogênico é removido, e as culturas são mantidas no meio de adipócito (AM) (DMEM/F-10 de Ham (1:1, vol/vol), 3% de soro de vitelo fetal, 1 µM de Dexametasona, 100 mM de insulina humana, 33 µM de D-biotina, 17 µM de pantotenato de sódio, 15 mM de HEPES, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 0,25 µg/ml de anfotericina B), com alimentação regular a cada três dias, assegurando apenas a remoção de metade do meio, e reabastecendo com um volume igual de AM, uma vez que os adipócitos irão flutuar se todos os meios

forem removidos. Depois de quatro alimentações (doze dias), as células parecem arredondadas com gotas de lipídio. A identificação positiva de células mesenquimais diferenciadas em adipócitos pode ser confirmada através da coloração por *Oil Red O* e *Nile Red*.

5 De forma similar, os condrócitos podem ser gerados ao usar suspensões de células preparadas a uma concentração de 10^4 células/cm² e colocadas em placas de cultura de tecido de 35 mm. Para a promoção as células condrogênicas são cultivadas sem soro e com um fator de crescimento de transformação $\beta 3$. Os pellets de células desenvolvem uma morfologia rica em matriz de múltiplas camadas e demonstram histologicamente um aumento na matriz extracelular rica em proteoglicano durante a cultura.

Para gerar mioblastos, as suspensões de células são preparadas a uma concentração de 10^4 células/cm² e colocadas em placas de cultura de tecido de 35 mm. As células são mantidas no meio MCDB 120 completado com 15% de soro bovino fetal (FBS) por uma semana (meio de proliferação de mioblasto, MPM). Em uma semana, o nível do soro no meio basal (MPM) cai para 2% (meio de diferenciação de mioblasto, MDM) e as culturas são concluídas depois de sete dias. As culturas são re-alimentadas três vezes em uma semana com o meio de cultura apropriado.

20 Desse modo, deve ser apreciado que a presente invenção forneça tecido de cordão umbilical criogenicamente preservado que pode ser uma fonte útil de células progenitoras viáveis, que possuem propriedades úteis para a produção de vários tecidos conectivos incluindo osso, e células progenitoras que são imuno-incompetentes e ideais para transplante em humanos para tratar condições do tecido conectivo incluindo doenças e 25 disfunções ósseas. As células progenitoras humanas são geradas a partir de extratos de uma zona particular de geléia de Wharton do cordão umbilical humano, a chamada zona perivascular, que se estende até próximo da parede

externa dos vasos do cordão. A população das células extraída dessa zona
exibe propriedades marcantes, incluindo uma proliferação rápida, mudanças na
morfologia das células, tal como testemunhado pela formação de colônias de
células que ocorrem antes do sétimo dia em todos os frascos sub-cultivados
5 (cerca de 7 a 10 duplicações) e o aparecimento da formação de nódulo ósseo
sem a adição de suplementos osteogênicos ao meio de cultura, bem como uma
freqüência relativamente alta de células MHC negativo duplo, cuja freqüência é
aumentada com o cultivo das células que foram congeladas.

Da forma utilizada no presente, o termo "cerca de" refere-se a um
10 valor que é +/-10% do valor qualificado por este termo. Desta forma, a
temperatura de "cerca de -70°C" pode se referir a uma temperatura na faixa de
63°C a 77°C.

As seguintes referências são incorporadas a presente invenção
como referência:

15

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aubin, JE, 1998, *Bone stem cells: J Cell Biochem Suppl*, v. 30-31, p. 73-82.

Canfield, AE, M J Doherty, B A Ashton, 2000, *Osteogenic
potential of vascular pericytes*, in JE Davies (ed), *Bone Engineering*: Toronto,
EM Squared, Inc., p. 143-151.

20

Caplan, AI, 1991, *Mesenchymal stem cells: J Orthop. Res*, v. 9, p. 641-650.

Chacko, AW, S R M Reynolds, 1954, *Architecture of deistended
and nondistended human umbilical cord tissues, with special reference to the
arteries and veins*. Carnegie Institution of Washington, *Contributions to
Embryology*, v. 35, p. 135-150.

25

Conget, P, J J Minguell, 1999, *Phenotypical and functional properties of
human bone marrow mesenchymal progenitor cells: J. Cell Physiol*, v. 181, p. 67-73.

Haynesworth, SE, D Reuben, A I Caplan, 1998, *Cell-based tissue
engineering therapies: the influence of whole body physiology.:* *Adv Drug Deliv*

Rev, v. 33, p. 3-14.

Kogler,G, S Sensken, J A Airey, T Trapp, M Muschen, N Feldhahn, S Liedtke, R V Sorg, J Fischer, C Rosenbaum, S Greschat, A Knipper, J Bender, O Degistirici, J Gao, A I Caplan, E J Colletti, G Almeida-Porada, H W Muller, E Zanjani, P Wernet, 2004, *A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential: J Exp. Med.*, v. 200, p. 123-135.

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

Parry, EW, 1970, *Some electron microscope observations on the mesenchymal structures of full-term umbilical cord: Journal of Anatomy*, v. 107, p. 505-518.

Pereda,J, P M Motta, 2002, *New advances in human embryology: morphofunctional relationship between the embryo and the yolk sac: Medical Electron Microscopy*, v. 32, p. 67-78.

Romanov,YA, V A Svintsitskaya, V N Smirnov, 2003, *Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: Candidate MSC-like cells from umbilical cord: Stem Cells*, v. 21, p. 105-110.

Schoenberg,MD, A Hinman, R D Moore, 1960, *Studies on connective tissue V, Feber formation in Wharton's Jelly.: Laboratory Investigation*, v. 9, p. 350-355.

Sen,A, Y R Lea-Currie, D Sujkowska, D M Franklin, W O Wilkison, Y D Halvorsen, J M Gimble, 2001, *Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous: J.Cell Biochem.*, v. 81, p. 312-319.

Takechi,K, Y Kuwabara, M Mizuno, 1993, *Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells: Placenta*, v. 14, p. 235-245.

Tuchmann-Duplessis, H, G David, P Haegel, 1972, *Illustrated Human Embryology*, New York, Springer-Verlag, p. 54-61.

Weiss, L, 1983, *Histology: cell and tissue biology*, New York, Elsevier Biomedical, p. 997-998.

5 Wharton, TW, 1656, *Adenographia*, Translated by Freer S. (1996).
Oxford, U.K., Oxford University Press, p. 242-248.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE RECUPERAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

5 1) obtenção de tecido de cordão umbilical armazenado criogenicamente, em que o tecido de cordão umbilical foi preparado pelo método que compreende as etapas de:

a) obtenção de tecido de cordão umbilical que compreende células viáveis;

10 b) combinação do tecido de cordão umbilical com uma solução de criopreservação que compreende meio de cultura de células contendo soro e um crioprotetor, e

c) submeter a combinação a um processo de congelamento, em que a combinação é refrigerada como um líquido por um período e a uma temperatura que permitem a penetração do crioprotetor no tecido,

15 d) congelamento da combinação resfriada, de forma a fornecer um tecido congelado e, opcionalmente,

e) armazenamento do tecido congelado sob condições criogênicas;

2) descongelamento do tecido do cordão umbilical congelado;

20 3) tratamento do tecido de cordão umbilical descongelado para colocar o crioprotetor com água; e

4) recuperação das células viáveis a partir do tecido de cordão umbilical desta forma tratado.

25 2. MÉTODO DE PRESERVAÇÃO DA VIABILIDADE DE CÉLULAS PRESENTES NO TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a) obtenção do tecido de cordão umbilical que compreende células viáveis;

b) combinação do tecido de cordão umbilical com uma solução criopreservante compreendendo um meio de cultura celular contendo soro e um criopreservante;

5 c) submeter a combinação à um processo de resfriamento, no qual a combinação é refrigerada como um líquido por um período e a uma temperatura que permita com que o criopreservante penetre no tecido;

d) congelar a combinação resfriada e, opcionalmente;

e) armazenar a combinação congelada sob condições criogênicas.

10 3. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o criopreservante é DMSO.

4. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura celular é soro bovino fetal.

15 5. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a solução criopreservante compreende, por volume, de 5 a 25% de DMSO e de 75 a 95% de soro bovino fetal.

6. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a solução criopreservante é 10% de DMSO e 90% de soro bovino fetal.

20 7. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o tecido de cordão umbilical é um vaso de cordão umbilical ou segmento do mesmo possuindo a geléia de Wharton perivascular compreendendo células progenitoras.

8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o tecido de cordão umbilical é tecido de cordão umbilical humano.

25 9. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o tecido de cordão umbilical é essencialmente livre de sangue.

10. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 9,

caracterizado pelo fato de que o processo de resfriamento é realizado a cerca de 4°C por um período de pelo menos 20 minutos.

5 11. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o processo de congelamento é realizado a cerca de -70°C.

12. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o armazenamento criogênico é realizado a cerca de -196°C.

10 13. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 e 3 a 12, caracterizado pelo fato de que o processo de descongelamento é realizado a cerca de 37°C.

14. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 e 3 a 13, caracterizado pelo fato de que o cordão descongelado é tratado por imersão com água ou tampão a cerca de 4°C.

15 15. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 e 3 a 14, caracterizado pelo fato de que as células viáveis recuperadas a partir de cordão umbilical armazenado, são células perivasculares de cordão umbilical humano.

20 16. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que as células viáveis são recuperadas pela digestão da geléia de Wharton.

17. TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL, em um estado criopreservado, caracterizado pelo fato de que compreende células progenitoras que são recuperadas em um estado viável, desde que preparadas pelo método conforme descrito em uma das reivindicações 2 a 14.

25 18. TECIDO, de acordo com a reivindicação 17, na forma de um banco de tecido, caracterizado pelo fato de que compreende uma série de recipientes compreendendo, cada um, uma amostra do dito tecido de cordão umbilical, e um catálogo fazendo referência ao conteúdo de cada recipiente.

19. TECIDO, de acordo com uma das reivindicações 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que o tecido de cordão umbilical é um vaso de cordão, ou um segmento do mesmo, que contém geléia de Wharton perivascular compreendendo células progenitoras.

5 20. MÉTODO DE RECUPERAÇÃO DE HUCPVCs VIÁVEIS, a partir de tecido de cordão umbilical congelado, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

1) obtenção do tecido de cordão umbilical armazenado criogenicamente, em que o tecido de cordão é fresco, isolado de vaso de
10 cordão umbilical humano ou um segmento do mesmo, contendo uma geléia de Wharton perivascular associada e sendo preparado pelo método que compreende as etapas de:

a) obtenção do dito tecido de cordão umbilical;

b) combinação do tecido de cordão umbilical com uma solução
15 crioconservante que compreende meio de cultura celular contendo soro e DMSO;

c) submeter a combinação a um processo de resfriamento, em que a combinação é refrigerada como um líquido por um período e a uma temperatura que permitam que o DMSO penetre no tecido;

d) congelamento da combinação refrigerada; e

20 e) armazenamento da combinação congelada sob condições criogênicas por um período de tempo; e, em seguida

2) descongelamento do tecido de cordão armazenado;

3) tratamento do tecido de cordão descongelado para colocar o DMSO com água; e

25 4) digestão da geléia de Wharton associada com os vasos armazenados para liberar HUCPVCs viáveis.

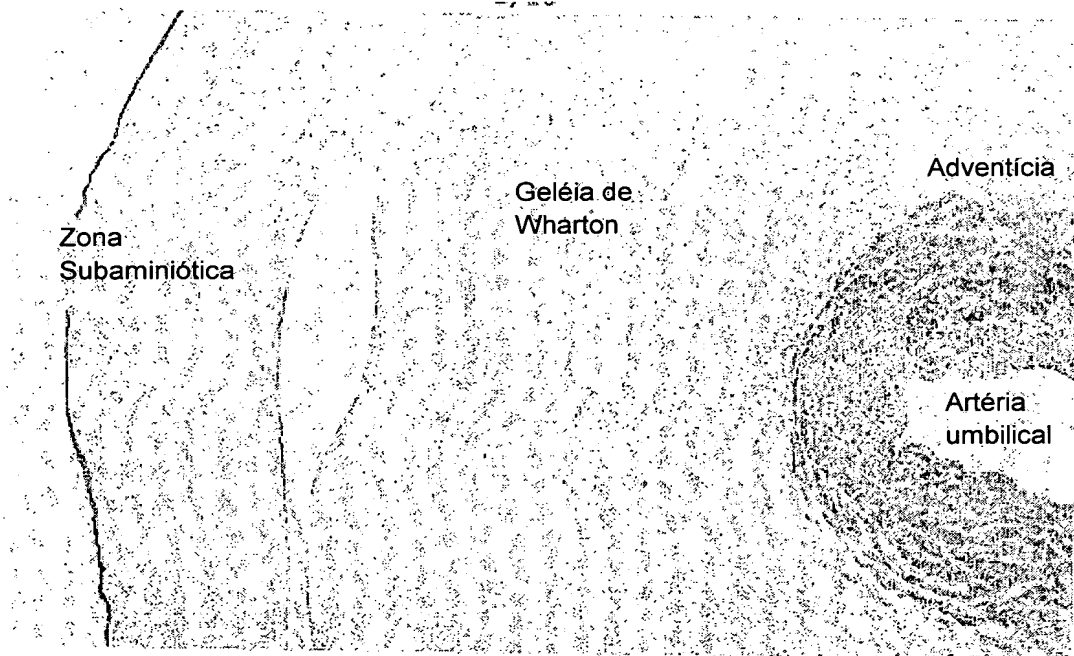


Fig. 1

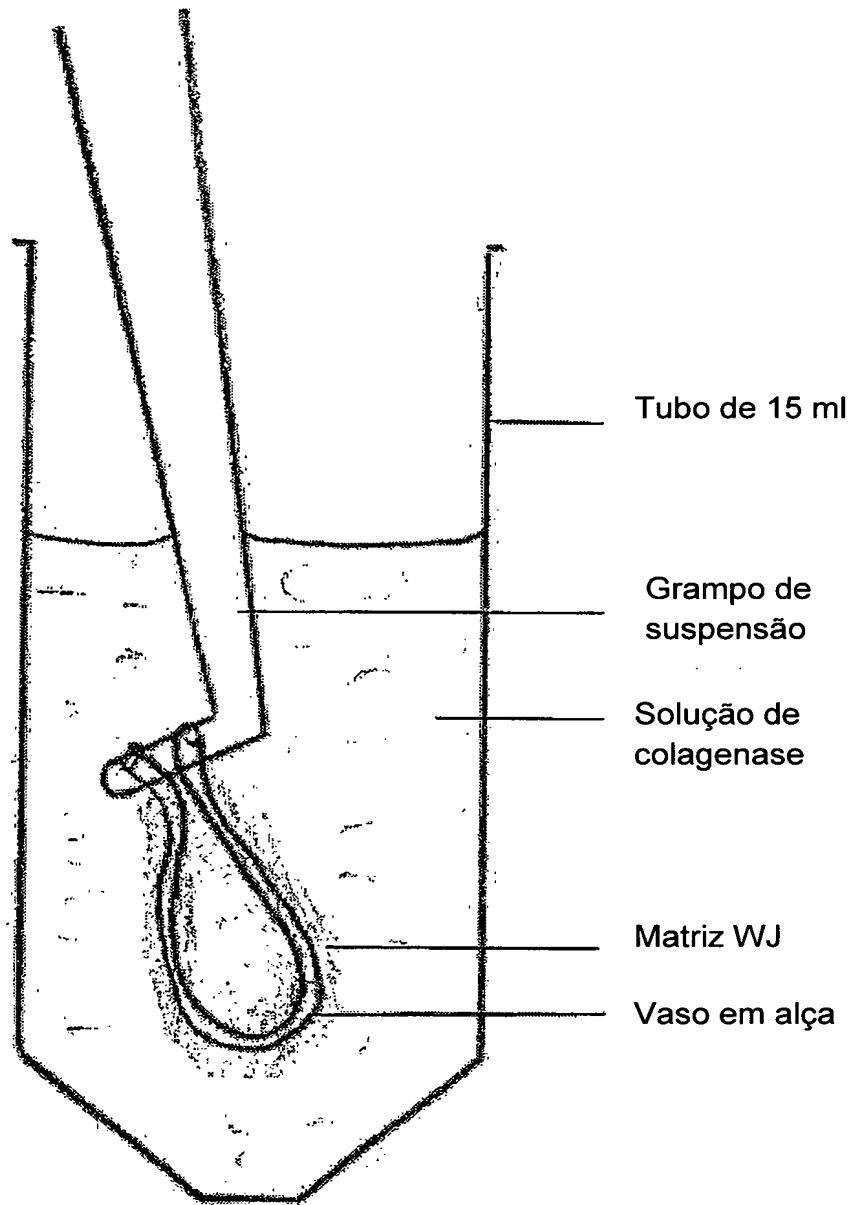


Fig. 2

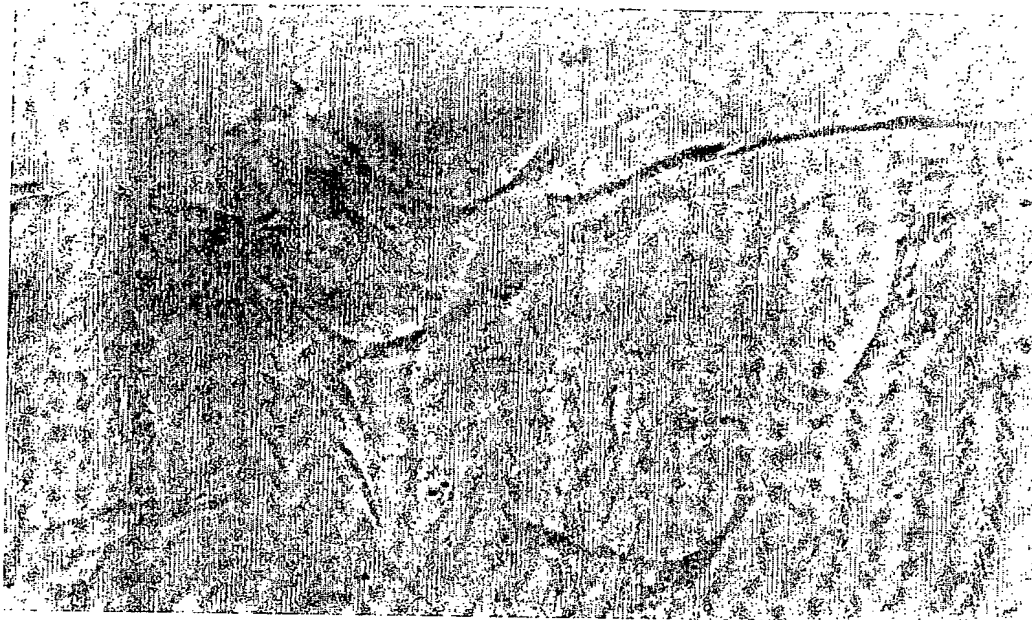


Fig. 3



Fig. 4

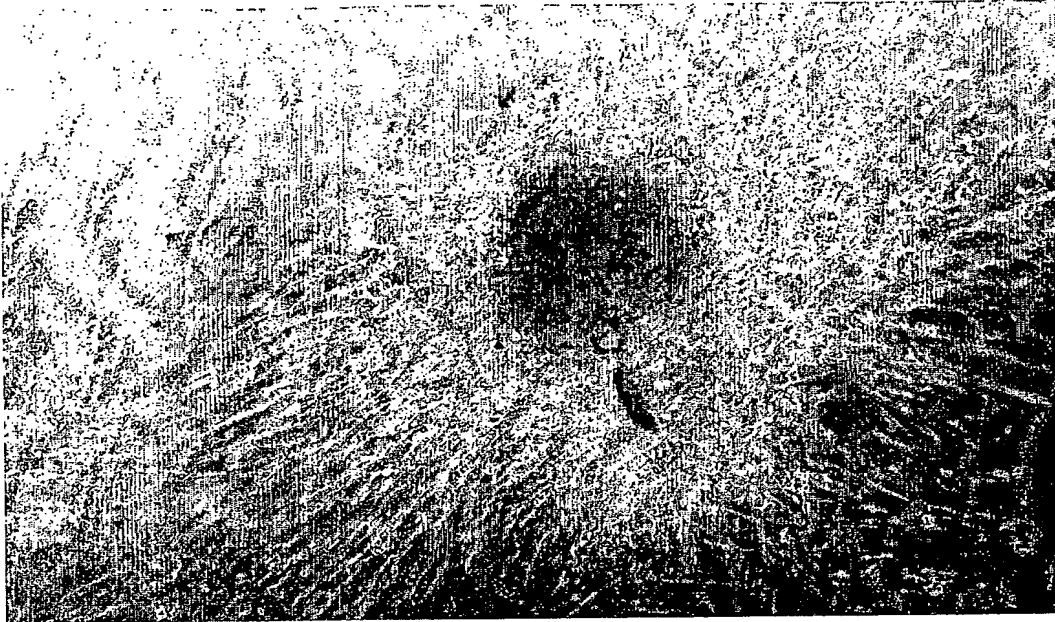


Fig. 5



Fig. 6

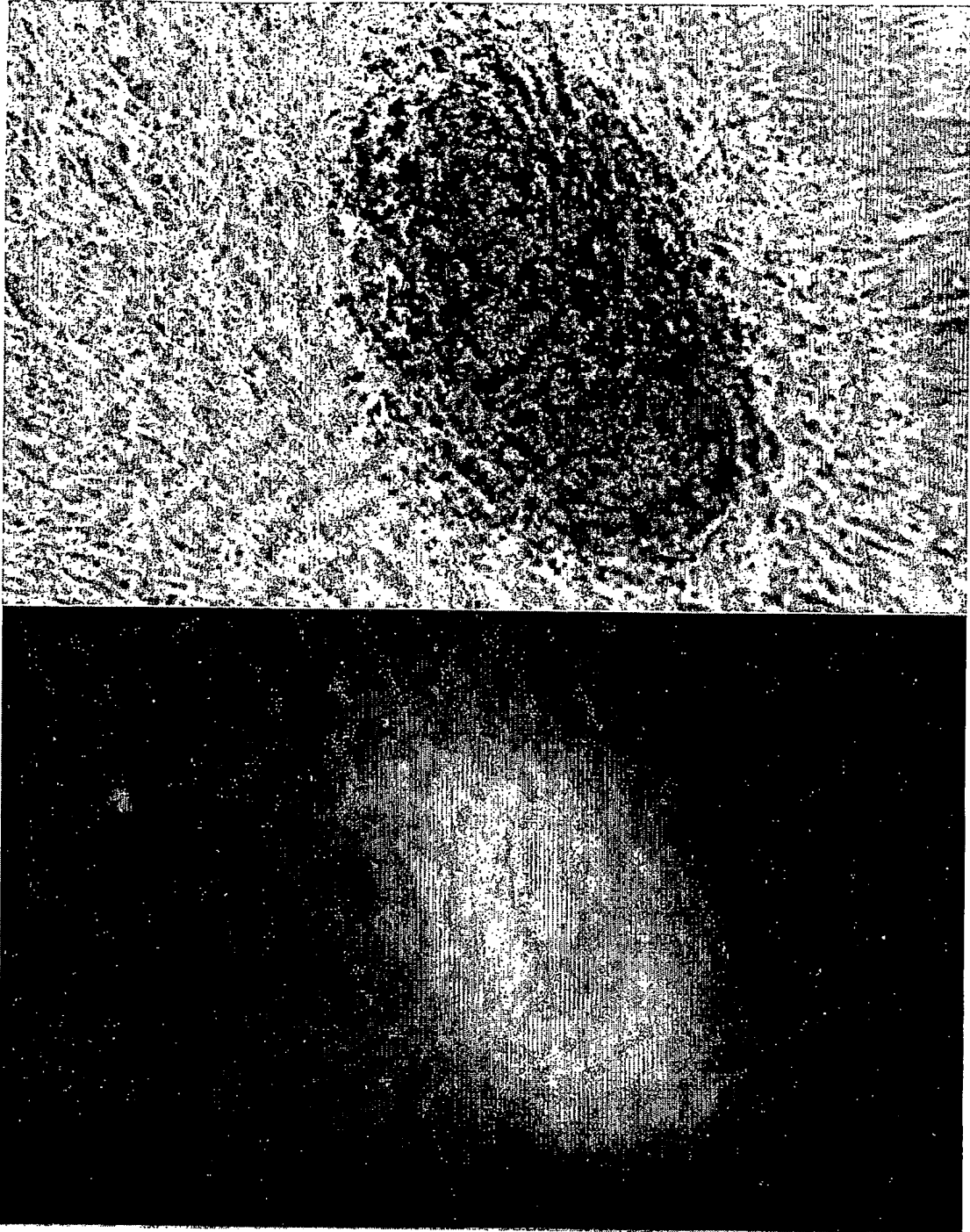


Fig. 7

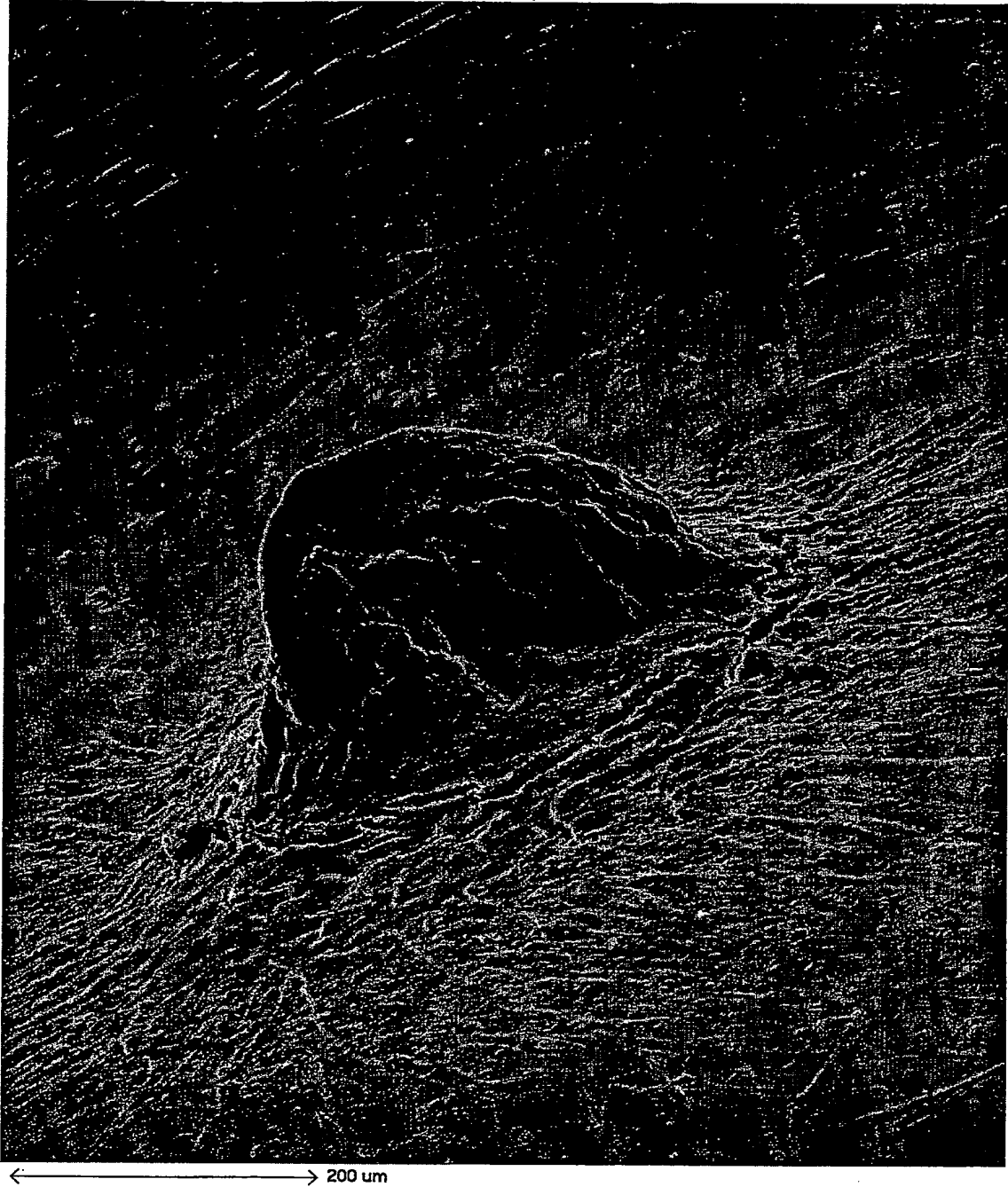


Fig. 8

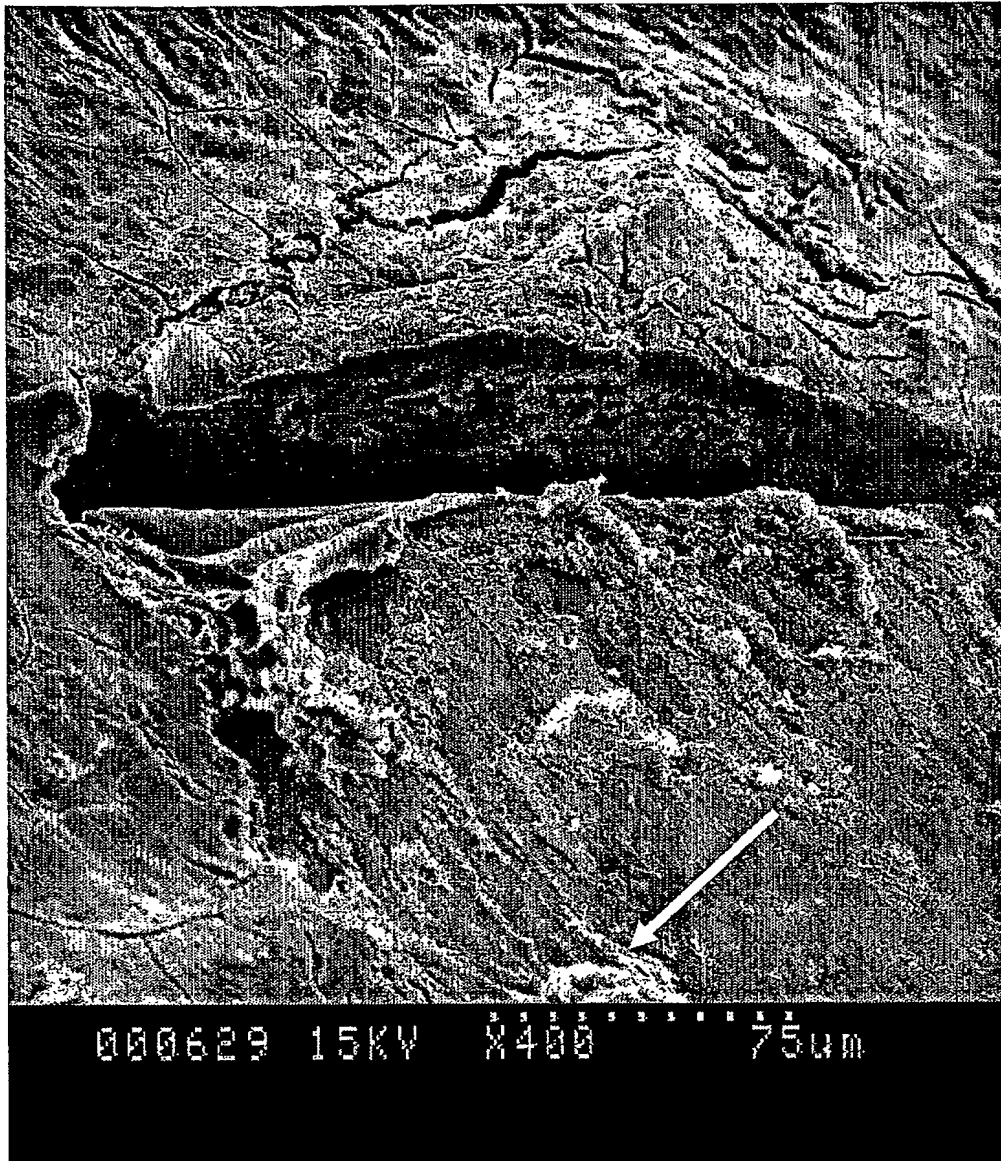


Fig. 9

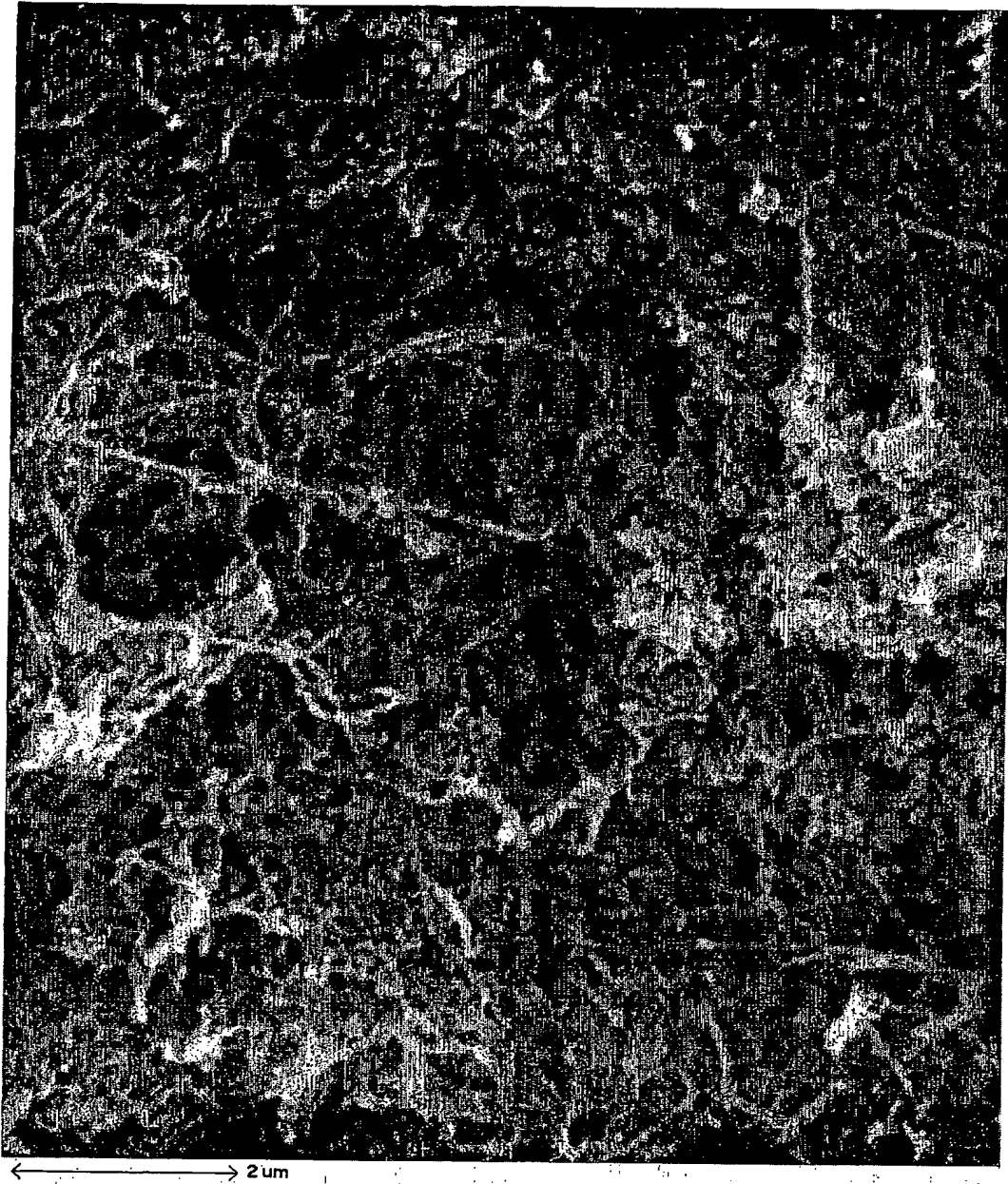


Fig. 10

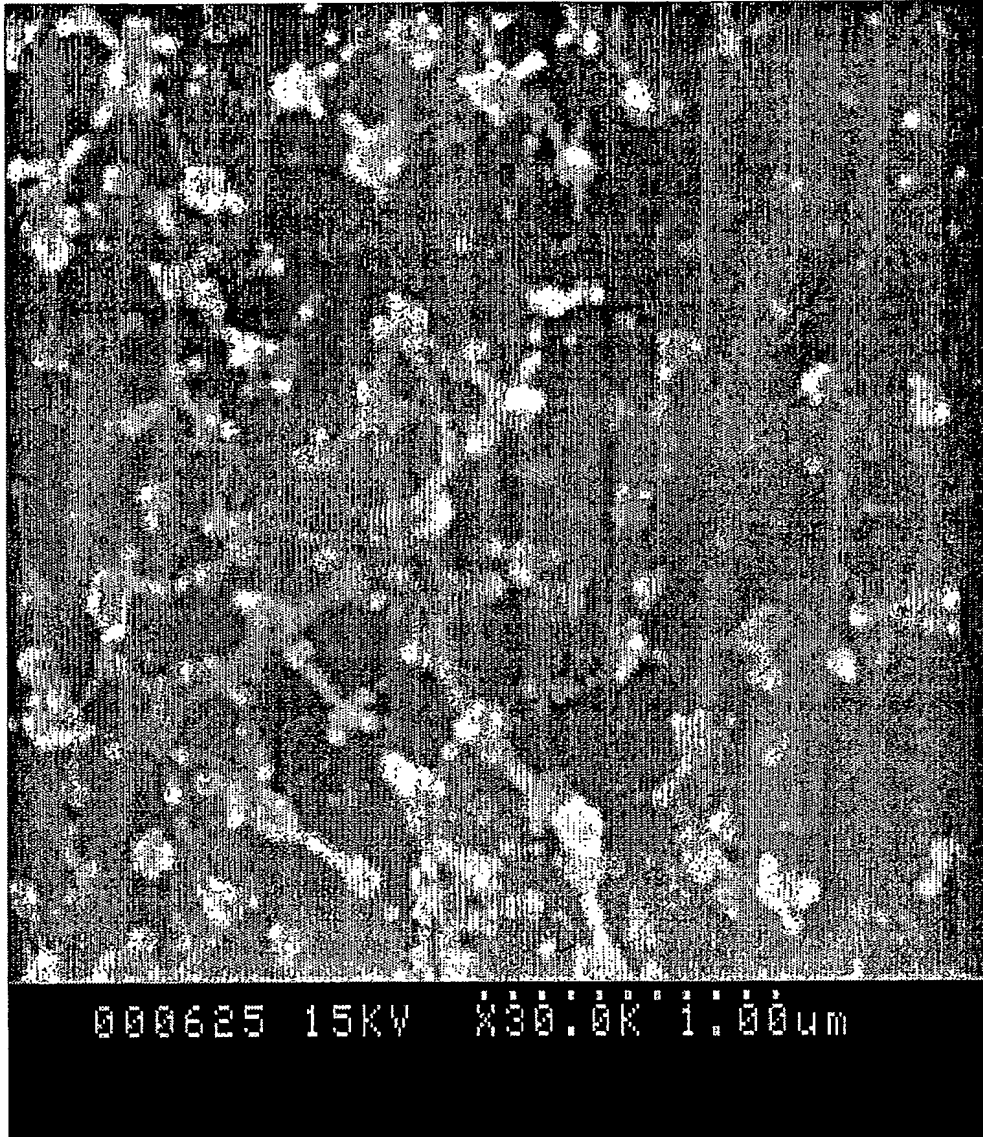


Fig. 11

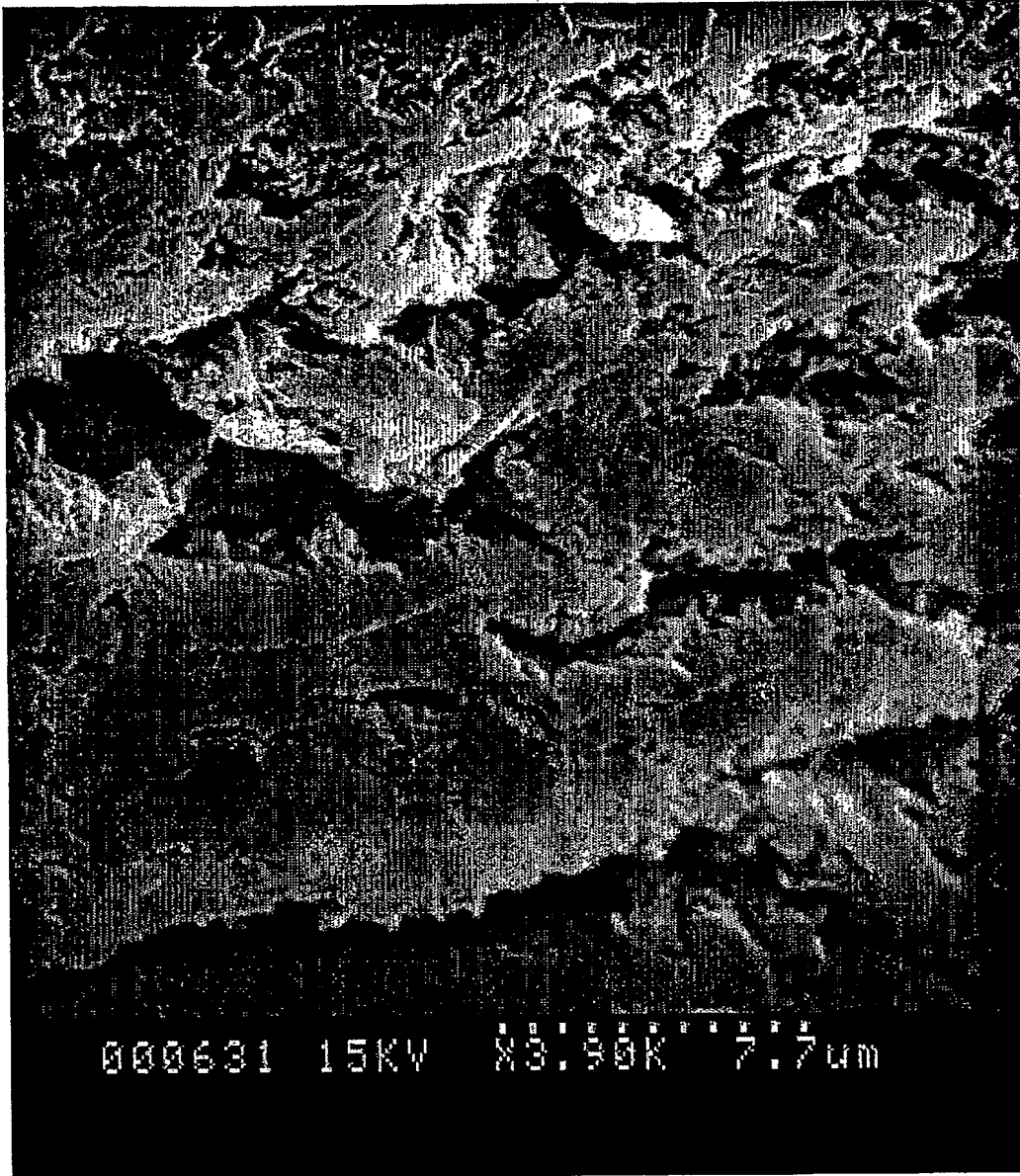


Fig. 12

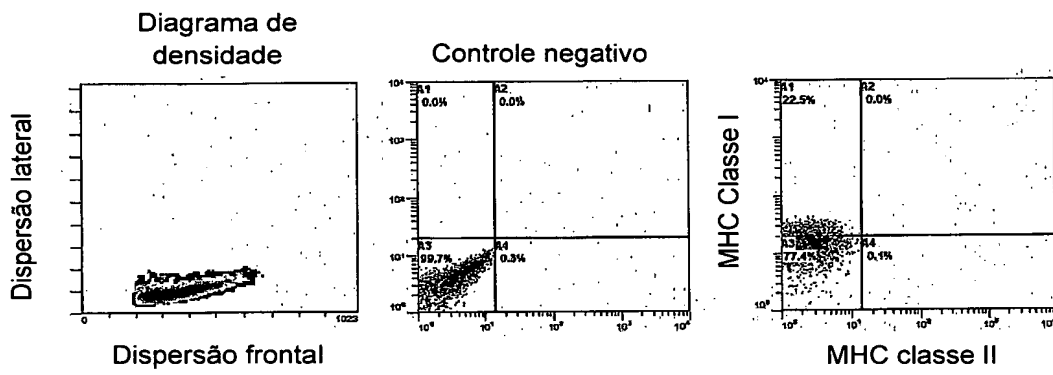


Fig. 13

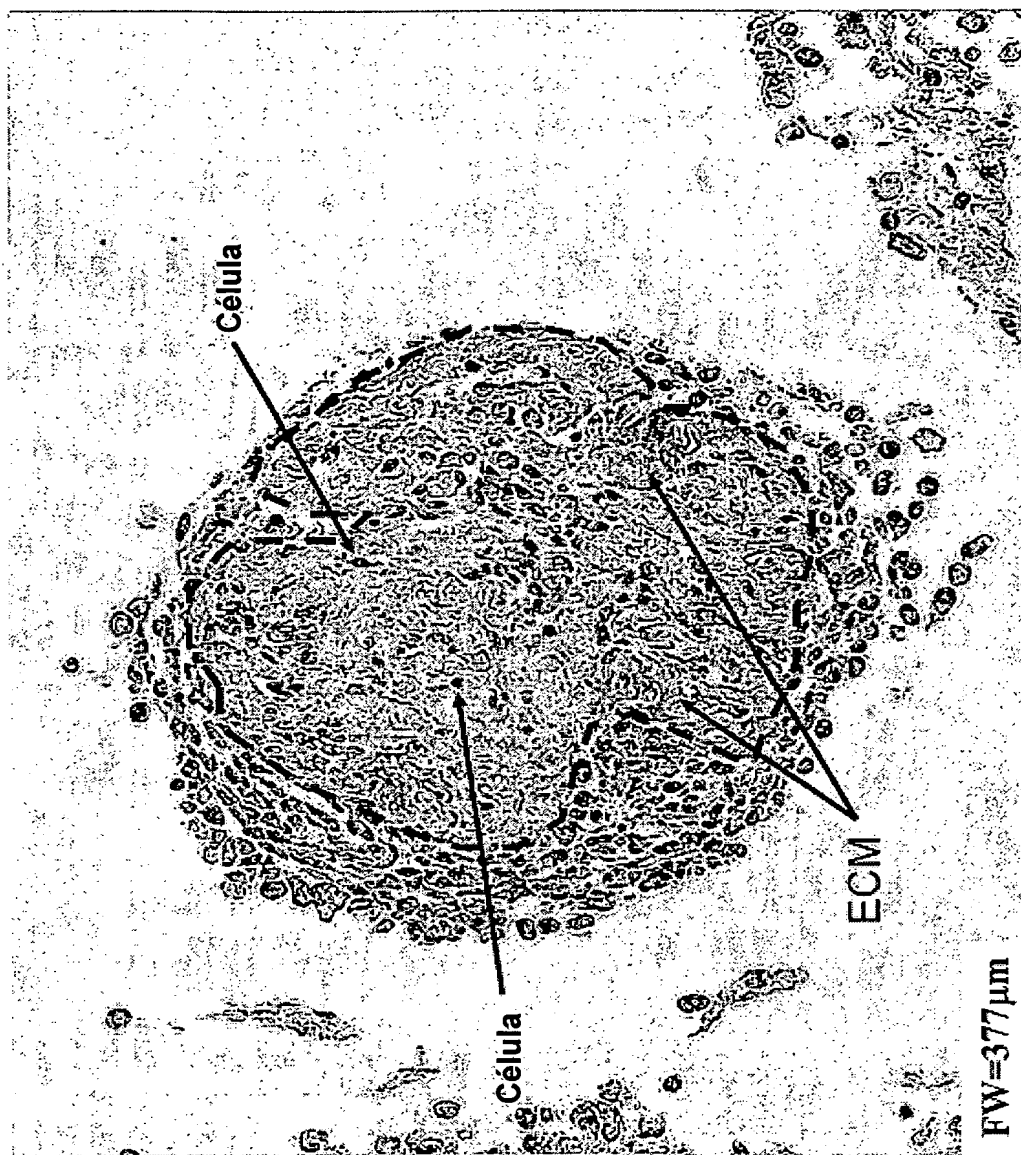


Fig. 14

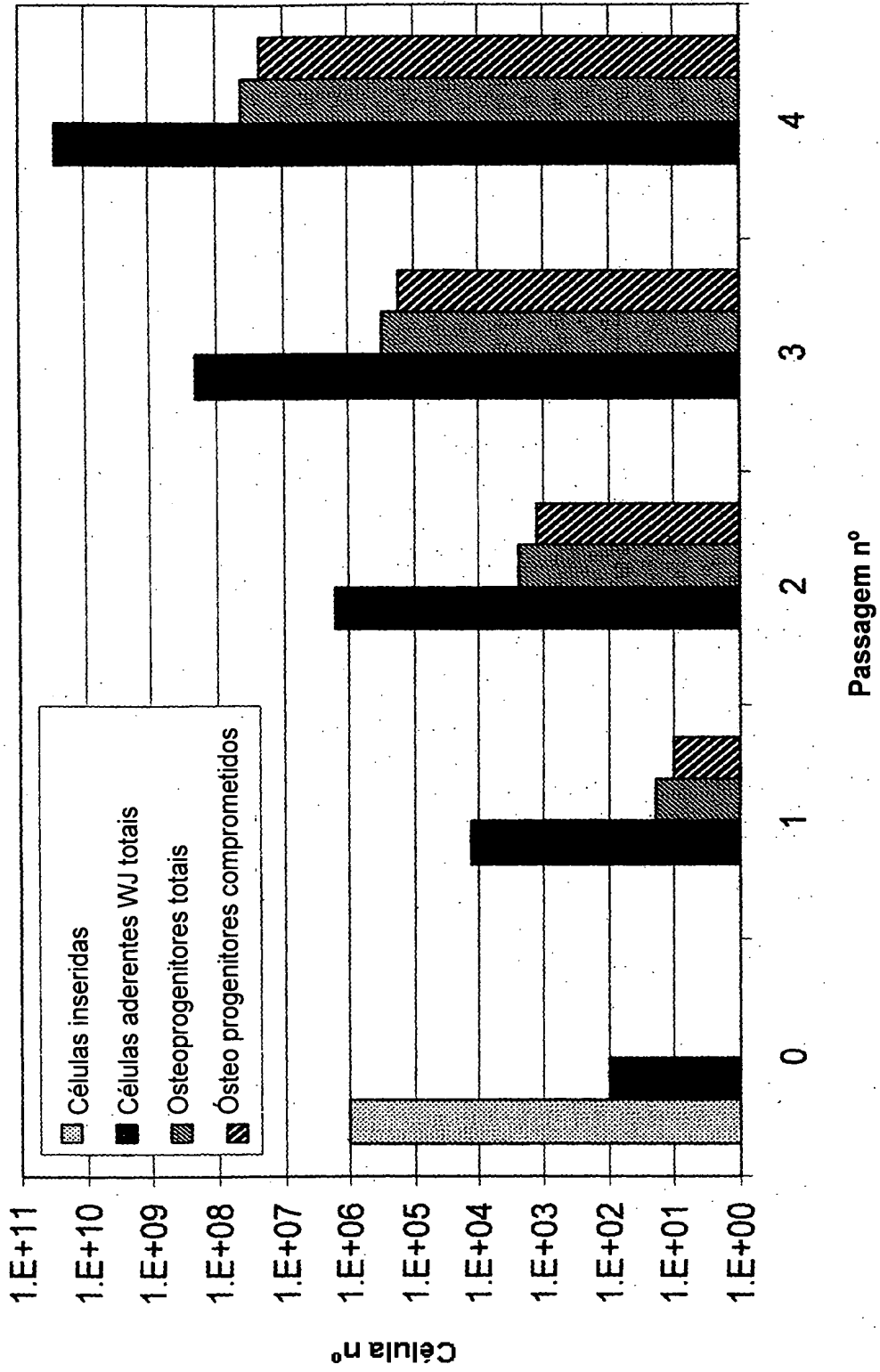


Fig. 15

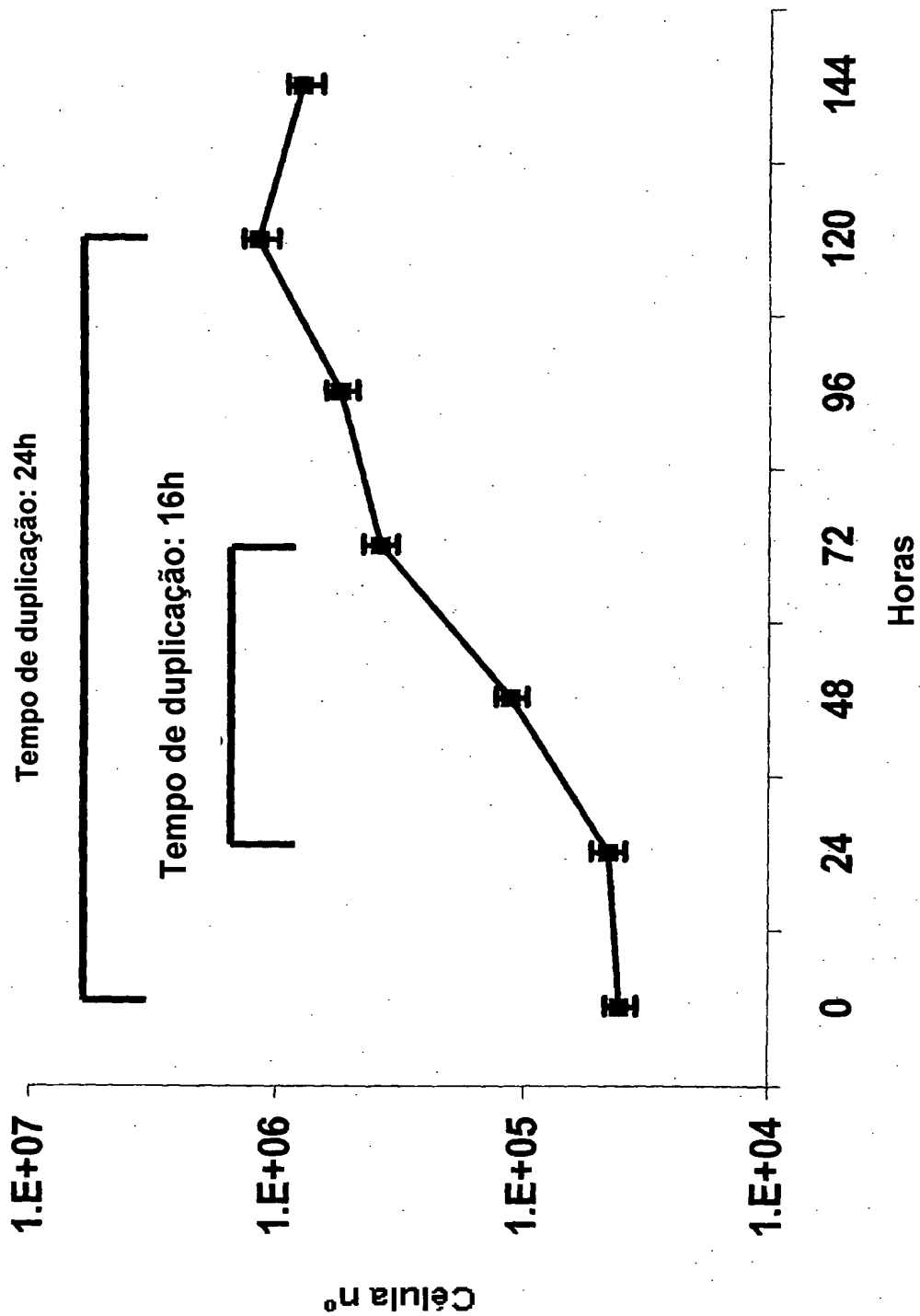


Fig. 16

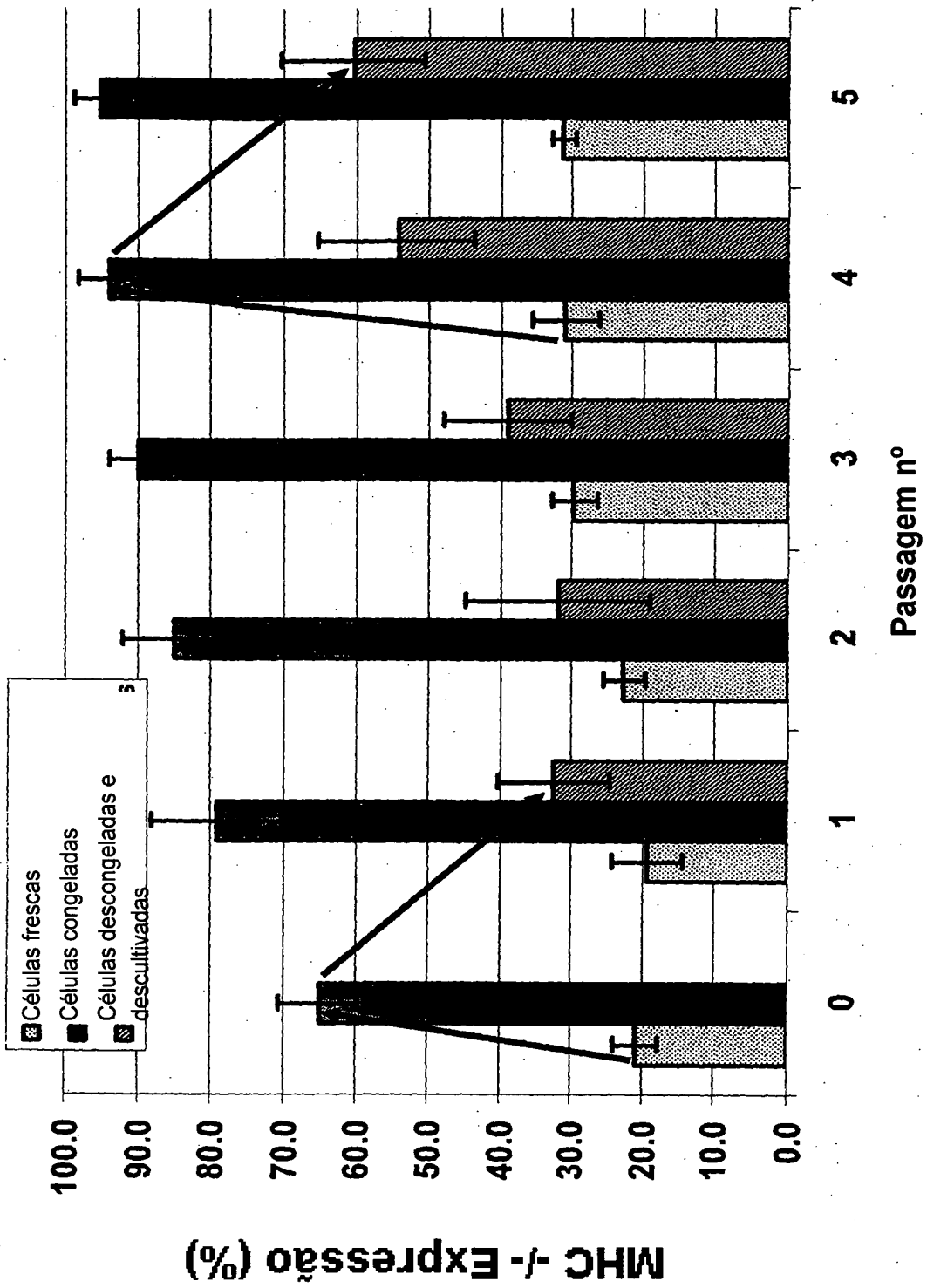
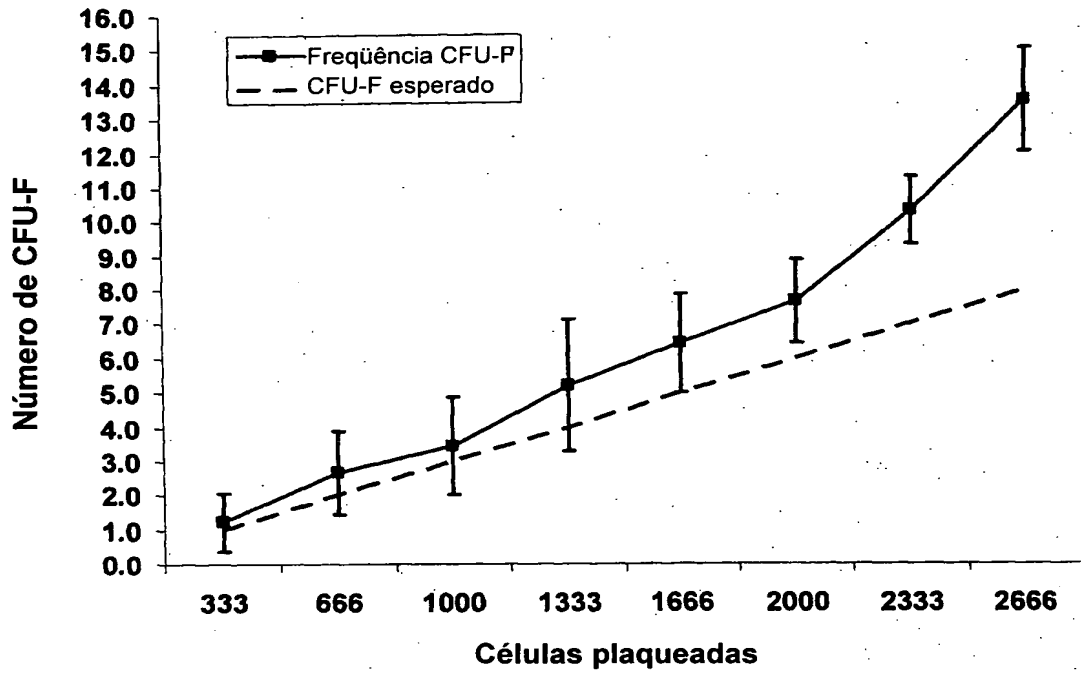
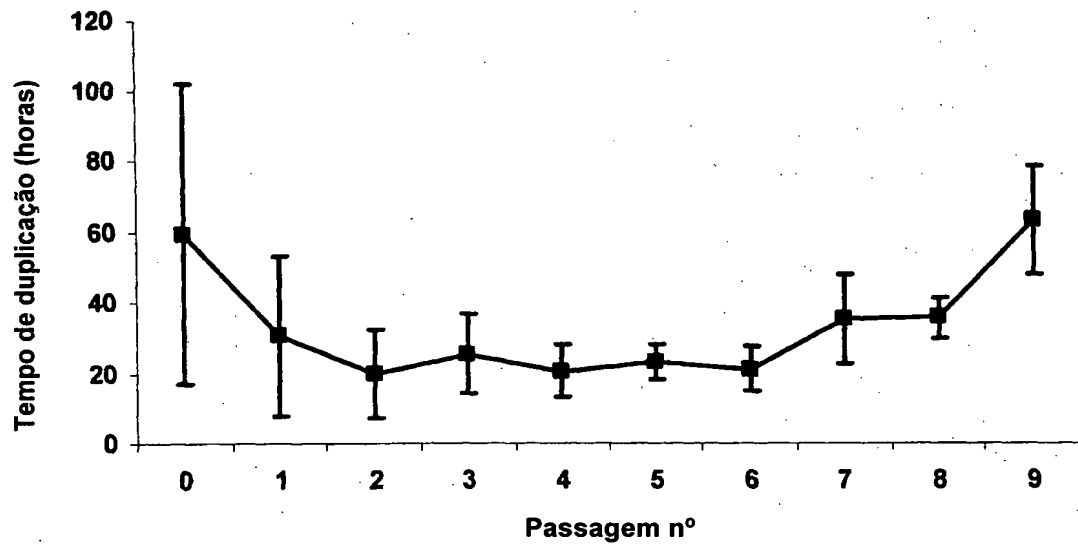


Fig. 17

**Fig. 18****Fig. 19**

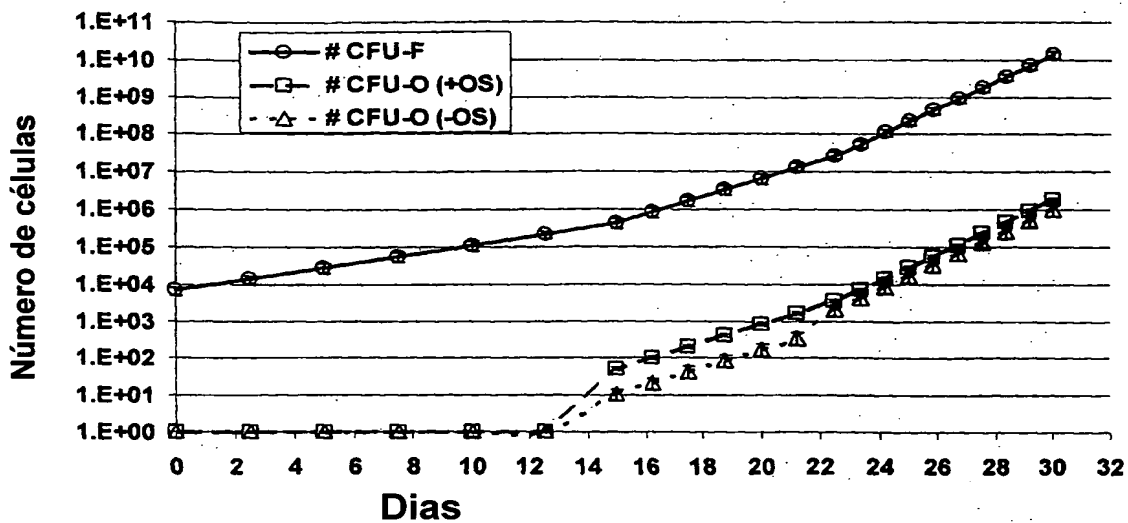


Fig. 20

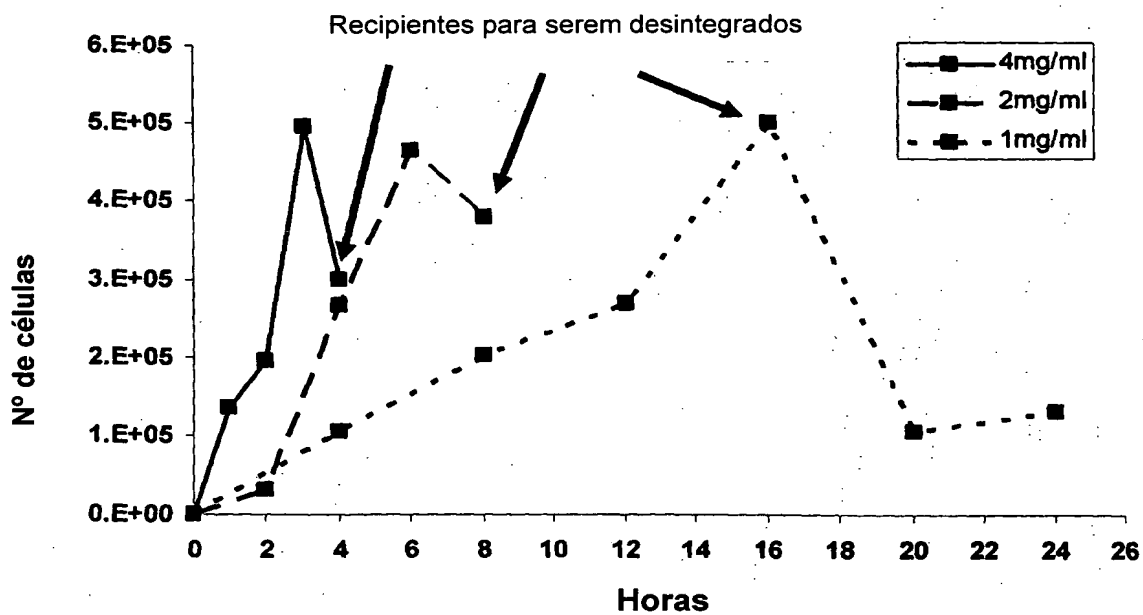


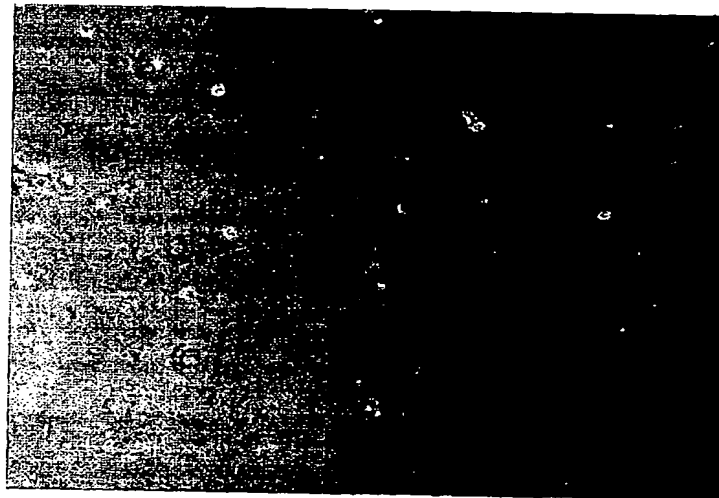
Fig. 21



Panel A



Panel B



Panel C

Fig. 22

RESUMO**“MÉTODO DE RECUPERAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO TECIDO DE
CORDÃO UMBILICAL, MÉTODO DE PRESERVAÇÃO DA VIABILIDADE DE
CÉLULAS PRESENTES NO TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL, TECIDO DE
5 CORDÃO UMBILICAL E MÉTODO DE RECUPERAÇÃO DE HUCPVCs
VIÁVEIS”**

A presente invenção refere-se a células progenitoras viáveis são
extraídas a partir de um tecido de cordão umbilical congelado. Em algumas
realizações, o tecido de cordão umbilical é um vaso sanguíneo que possui geléia
10 de Wharton perivascular, e onde as células progenitoras extraídas são HUCPVCs.