(11) Número de Publicação: **PT 2247285 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 35/28 (2014.01) ***A61K 35/50*** (2014.01)
A61K 35/12 (2014.01) ***A61P 13/00*** (2014.01)
C12N 5/74 (2014.01) ***A61K 9/00*** (2014.01)
C12N 5/00 (2014.01)

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

(22) Data de pedido: **2008.12.01**

(30) Prioridade(s): **2007.11.30 KR 20070124010**

(43) Data de publicação do pedido: **2010.11.10**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.06.11**
141/2014

(73) Titular(es):
RNL BIO CO., LTD.
1596-7 BONGCHEON-DONG, GWANAK-GU
SEOUL 151-050 **KR**

(72) Inventor(es):
JEONG CHAN RA **KR**
HANG YOUNG LEE **KR**
JUNG YOUN JO **KR**
YUN JUNG KIM **KR**

(74) Mandatário:
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **AGENTE TERAPÊUTICO CELULAR PARA INCONTINÊNCIA DE URINA COMPREENDENDO CÉLULAS ESTAMINAIS ORIGINÁRIAS DE DECÍDUA**

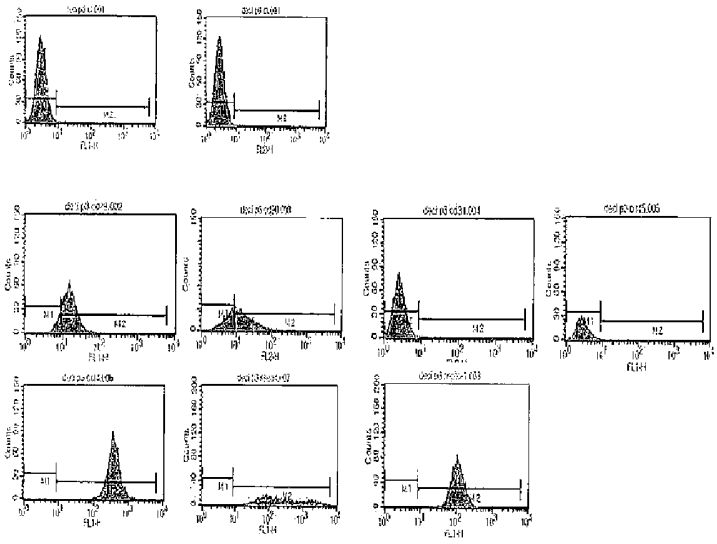
(57) Resumo:
A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM AGENTE TERAPÊUTICO CELULAR PARA O TRATAMENTO DE INCONTINÊNCIA URINÁRIA, E MAIS PARTICULARMENTE A UM AGENTE TERAPÊUTICO CELULAR PARA O TRATAMENTO DE INCONTINÊNCIA URINÁRIA, QUE CONTÉM CÉLULAS ESTAMINAIS DERIVADAS DA DECÍDUA DA PLACENTA OU DO FLUIDO MENSTRUAL OU CÉLULAS ESTAMINAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSO. AS CÉLULAS ESTAMINAIS DERIVADAS DA DECÍDUA OU AS CÉLULAS ESTAMINAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSO APRESENTAM OS EFEITOS DE AUMENTO DA PRESSÃO DE PERDA URINÁRIA E DA CONTRACTILIDADE DO ESFÍNCTER URETRAL, E ASSIM SÃO ÚTEIS COMO UM AGENTE PARA O TRATAMENTO DE INCONTINÊNCIA URINÁRIA.

RESUMO

"Agente terapêutico celular para incontinência de urina compreendendo células estaminais originárias de decídua"

A presente invenção refere-se a um agente terapêutico celular para o tratamento de incontinência urinária, e mais particularmente a um agente terapêutico celular para o tratamento de incontinência urinária, que contém células estaminais derivadas da decídua da placenta ou do fluido menstrual ou células estaminais derivadas de tecido adiposo. As células estaminais derivadas da decídua ou as células estaminais derivadas de tecido adiposo apresentam os efeitos de aumento da pressão de perda urinária e da contractilidade do esfíncter uretral, e assim são úteis como um agente para o tratamento de incontinência urinária.

FIG. 4



DESCRIÇÃO

"Agente terapêutico celular para incontinência de urina compreendendo células estaminais originárias de decídua"

CAMPO TÉCNICO

A presente invenção refere-se a um agente terapêutico celular para o tratamento de incontinência urinária, e mais particularmente a um agente terapêutico celular para o tratamento de incontinência urinária, que contém células estaminais derivadas da decídua da placenta ou do fluido menstrual.

ESTADO DA TÉCNICA

Células estaminais referem-se a células possuindo, não apenas capacidade de auto-replicação, mas também a capacidade de se diferenciarem em pelo menos duas células, e podem ser divididas em células estaminais totipotentes, células estaminais pluripotentes e células estaminais multipotentes.

As células estaminais totipotentes são células com propriedades totipotentes capazes de se desenvolver num indivíduo perfeito, e estas propriedades são possuídas por células até ao estádio celular 8 após a fertilização de um oócito e um espermatozóide. Quando estas células são isoladas e transplantadas para o útero, podem desenvolver-se num indivíduo perfeito. As células estaminais pluripotentes, que são células capazes de se desenvolver em várias células e tecidos derivados das camadas ectodérmica, mesodérmica e endodérmica, são derivadas de uma massa celular interna localizada no interior de blastocistos gerados 4-5 dias após a fertilização. Estas células são denominadas "células estaminais embrionárias" e podem diferenciar-se em várias outras células de tecidos mas não formar novos organismos vivos. As células estaminais multipotentes são células estaminais capazes de se diferenciar apenas em células específicas de tecidos e órgãos contendo essas células.

As células estaminais multipotentes foram pela primeira vez isoladas da medula óssea adulta (Y. Jiang *et al.*, *Nature*,

418:41, 2002), e foram depois também encontradas em outros diversos tecidos adultos (C.M. Verfaillie, *Trends Cell Biol.*, 12:502, 2002). Por outras palavras, embora a medula óssea seja a fonte mais amplamente conhecida de células estaminais, as células estaminais multipotentes foram também encontradas na pele, vasos sanguíneos, músculos e cérebros (J.G. Tomas *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, 3:778, 2001; M. Sampaolesi *et al.*, *Science*, 301:487, 2003; Y. Jiang *et al.*, *Exp. Hematol.*, 30:896, 2002). Contudo, as células estaminais muito raramente estão presentes em tecidos adultos, tais como medula óssea, e essas células são difíceis de cultivar sem induzir diferenciação, e portanto difíceis de cultivar na ausência de meios especificamente rastreados. Nomeadamente, é muito difícil manter as células estaminais isoladas *in vitro*.

Recentemente, verificou-se que o tecido adiposo constitui uma nova fonte de células estaminais multipotentes (B. Cousin *et al.*, *BBRC.*, 301:1016, 2003; A. Miranville *et al.*, *Circulation*, 110:349, 2004; S. Gronthos *et al.*, *J. Cell Physiol.*, 189:54, 2001; M.J. Seo *et al.*, *BBRC.*, 328:258, 2005). Nomeadamente, foi reportado que está incluído um grupo de células indiferenciadas no tecido adiposo humano obtido por lipossucção que têm a capacidade de se diferenciar em células de gordura, células osteogénicas, mioblastos e condroblastos (P.A. Zuk *et al.*, *Tissue Eng.*, 7:211, 2001; A.M. Rodriguez *et al.*, *BBRC.*, 315:255, 2004). Este tecido adiposo tem a vantagem de que pode ser extraído em grandes quantidades, e assim, recebe atenção como nova fonte de células estaminais, que pode ultrapassar as desvantagens existentes. Igualmente, estudos recentes utilizando experiências com modelos animais divulgam que as células derivadas do tecido adiposo têm as capacidades de regenerar músculos e estimular a diferenciação de vasos sanguíneos neurais. Assim, estas células derivadas de tecido adiposo estão a receber atenção como uma nova fonte de células estaminais.

Os presentes inventores anteriormente cultivaram tecido de placenta finamente cortado, num meio contendo colagenase e bFGF, isolaram as células estaminais placentárias do caldo de cultura, e depois deixaram as células estaminais isoladas diferenciar-se em miócitos, células osteogénicas, neurócitos,

adipócitos, condrócitos e células beta pancreáticas (Publicação de Patente Coreana N.º 2007-0101756 A).

Entretanto, a incontinência urinária nas mulheres é causada por flacidez da uretra e da bexiga, que resulta do enfraquecimento dos músculos do pavimento pélvico que surge de danos no nervo pudendo devidos a partos frequentes e ao envelhecimento. Presentemente, o número de pacientes do sexo feminino com incontinência urinária na Coreia está estimado em cerca de 4 000 000-5 000 000 e está a aumentar todos os anos devido ao rápido aumento do número de mulheres idosas. Assim, a incontinência urinária feminina está a tornar-se um sério problema social a nível mundial. Para tratar os pacientes com incontinência urinária, utilizam-se a terapia de injecção ou a terapia cirúrgica para suportar a uretra e a bexiga. Presentemente, a terapia cirúrgica, que é um método invasivo, tem problemas pois podem ocorrer complicações, e a terapia de injecção tem problemas pois emprega substâncias dispendiosas, e portanto não podem ser facilmente aplicadas a todos os pacientes, e têm uma taxa de sucesso de apenas 50-60%, de modo que a injecção e a cirurgia são necessárias novamente.

A terapia de injecção de células estaminais não necessita de anestesia e permite a fácil injecção de células estaminais no esfíncter uretral. Assim, se a terapia de injecção de células estaminais puder melhorar a contractilidade do esfíncter uretral e aumentar a pressão de perda urinária (“*leak point pressure*”), a terapia com células estaminais pode ser vantajosamente utilizada para tratar a incontinência urinária. Contudo, não existe nenhum estudo sobre a utilização de células estaminais para o tratamento de incontinência urinária excepto a divulgação de US 2005/0025755 onde são utilizadas células regenerativas derivadas de tecido adiposo.

Deste modo, os presentes inventores empreenderam muitos esforços para desenvolver um agente para o tratamento de incontinência urinária contendo células estaminais e, em resultado, verificaram que as células estaminais derivadas da decídua placentária são eficazes para o tratamento de incontinência urinária, desse modo completando a presente invenção.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

É portanto um objecto principal da presente invenção proporcionar um agente terapêutico celular para o tratamento de incontinência urinária, que contém, como ingrediente activo, células estaminais derivadas da decídua da placenta ou do fluido menstrual.

Outro objecto da presente invenção consiste em proporcionar um método para a preparação de um agente terapêutico celular para o tratamento de incontinência urinária, que contém, como ingrediente activo, células estaminais derivadas da decídua da placenta ou do fluido menstrual.

Ainda outro objecto da presente invenção consiste em proporcionar a utilização de células estaminais derivadas da decídua da placenta ou do fluido menstrual para prevenção ou tratamento de incontinência urinária.

Outras características e concretizações da presente invenção serão mais evidentes a partir da seguinte descrição detalhada e das reivindicações anexas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A FIG. 1 é uma fotografia de microscópio que mostra a morfologia de células estaminais mesenquimatosas (MSC) derivadas da decídua da placenta.

A FIG. 2 é um diagrama gráfico que mostra o nível cumulativo de duplicação da população (CPDL, do inglês "*cumulative population doubling level*") em função do número de passagens de células estaminais derivadas da decídua.

A FIG. 3 é uma fotografia que mostra que as células da decídua de primeira passagem cultivadas em meio SFM formaram esferas.

A FIG. 4 é uma fotografia que mostra os resultados obtidos por análise de antigénios de superfície de MSC derivadas da decídua utilizando um citómetro de fluxo (FACS).

A FIG. 5 é uma fotografia que mostra os resultados da análise imunocitoquímica realizada utilizando os anticorpos indicados [A: OCT4; B: SSEA4; e C: CD44, CD54 e controlo].

A FIG. 6 mostra os resultados de RT-PCR para OCT4 [pista 1: marcador; pista 2: controlo da reacção por RT; pista 3: células estaminais amnióticas; pista 4: células estaminais derivadas da decídua; e pista 5: controlo da reacção PCR].

A FIG. 7 é uma fotografia de microscópio que mostra os resultados da análise imunocitoquímica (ïOsina-FITC) para células estaminais derivadas da decídua induzidas durante 10 dias em meio MM-3160 (meio SKBM para diferenciação miogénica) em miogénese.

A FIG. 8 é uma fotografia que mostra que o nervo pudendo de um ratinho nu está seccionado transversalmente.

A FIG. 9 é uma fotografia que mostra um processo de medição da pressão de perda urinária utilizando uma plataforma basculante (A e B).

A FIG. 10 é um diagrama gráfico que mostra os resultados da pressão de perda urinária medida de acordo com os resultados obtidos no Exemplo 6 (A: pressão de perda urinária a 4 semanas, B: pressão de perda urinária a 8 semanas, N: grupo normal, D: grupo de controlo, P1: grupo experimental 1, e P2: grupo experimental 2).

A FIG. 11 é um diagrama gráfico que mostra os resultados da pressão de perda urinária medida de acordo com os resultados obtidos no Exemplo 7 (A: pressão de perda urinária a 4 semanas, B: pressão de perda urinária a 8 semanas, N: grupo normal, D: grupo de controlo, A1: grupo experimental 1, e A2: grupo experimental 2).

A FIG. 12 é uma fotografia que mostra um processo de medição da contractilidade do esfíncter uretral utilizando um banho de órgãos (A e B).

A FIG. 13 é um diagrama gráfico que mostra a contractilidade do esfíncter uretral medida por estimulação com campo eléctrico, de acordo com os resultados obtidos no Exemplo 8 (A: contractilidade do esfíncter uretral a 4 semanas; B: contractilidade do esfíncter uretral a 8 semanas; N: grupo normal; D: grupo de controlo; P1: grupo experimental 1; e P2: grupo experimental 2).

A FIG. 14 é um diagrama gráfico que mostra a contractilidade do esfíncter uretral medida por administração de acetilcolina, de acordo com os resultados obtidos no Exemplo 8 (A: contractilidade do esfíncter uretral a 4 semanas; B: contractilidade do esfíncter uretral a 8 semanas; N: grupo normal; D: grupo de controlo; P1: grupo experimental 1; e P2: grupo experimental 2).

A FIG. 15 é um diagrama gráfico que mostra a contractilidade do esfíncter uretral medida por estimulação com campo eléctrico, de acordo com os resultados obtidos no Exemplo 9 (A: contractilidade do esfíncter uretral a 4 semanas; B: contractilidade do esfíncter uretral a 8 semanas; N: grupo normal; D: grupo de controlo; A1: grupo experimental 1; e A2: grupo experimental 2).

A FIG. 16 é um diagrama gráfico que mostra a contractilidade do esfíncter uretral medida pela administração de acetilcolina, de acordo com os resultados obtidos no Exemplo 9 (A: contractilidade do esfíncter uretral a 4 semanas; B: contractilidade do esfíncter uretral a 8 semanas; N: grupo normal; D: grupo de controlo; A1: grupo experimental 1; e A2: grupo experimental 2).

A FIG. 17 mostra os resultados da coloração H/E, imunocoloração com SMA e imunocoloração com MyHC de tecido uretral de ratinhos nus fêmeas, conduzidas no Exemplo 10.

A FIG. 18 mostra os resultados da imunocoloração H/E do tecido uretral de ratinhos machos, de acordo com os resultados obtidos no Exemplo 10.

A FIG. 19 mostra os resultados da coloração H/E, imunocoloração com SMA e imunocoloração com MyHC do tecido

uretral de ratinhos nus fêmeas, de acordo com os resultados obtidos no Exemplo 11.

A FIG. 20 mostra os resultados da imunocoloração H/E do tecido uretral de ratinhos machos, de acordo com os resultados obtidos no Exemplo 11.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO, E CONCRETIZAÇÕES PREFERIDAS

Num aspecto, a presente invenção refere-se a um agente terapêutico celular para o tratamento de incontinência urinária, que contém células estaminais derivadas da decídua da placenta ou do fluido menstrual, como ingrediente activo.

Na presente invenção, as células estaminais derivadas da decídua da placenta têm as seguintes características: (a) apresentam imunofenótipos positivos para CD29 e CD90, mas negativos para CD31 e CD45; (b) apresentam imunofenótipos positivos para Oct4, SSEA-4 e Cripto-1; (c) crescem fixadas a plástico, apresentando características morfológicas de formato redondo ou em fuso, e formam esferas em meio SFM de modo que são susceptíveis de serem mantidas num estado indiferenciado durante um longo período de tempo; e (d) têm a capacidade de se diferenciar em miócitos.

1. Definição de termos

Como aqui se utiliza, a expressão "célula estaminal" refere-se a uma célula mestra que se pode reproduzir indefinidamente para formar as células especializadas de tecidos e órgãos e inclui células estaminais de desenvolvimento pluripotente e multipotente. Uma célula estaminal pode dividir-se para produzir duas células estaminais filhas, ou uma célula estaminal filha e uma célula progenitora ("transitória"), que depois prolifera originando células de tecidos maduras, completamente formadas.

Como aqui se utiliza, o termo "diferenciação" refere-se a um fenómeno em que a estrutura ou a função de células é especializada durante a sua divisão, a sua proliferação e o seu crescimento, ou seja, a característica ou função da célula ou do tecido de um organismo altera-se de modo a realizar o trabalho dado à célula ou ao tecido. Geralmente, refere-se a um fenómeno em que um sistema relativamente simples é dividido

em dois ou mais sistemas parciais qualitativamente diferentes. Por exemplo, significa que ocorre uma diferença qualitativa entre as partes de qualquer sistema biológico, que eram idênticas uma à outra no início, por exemplo, ocorre uma distinção, tal como uma cabeça ou um corpo, entre partes do ovo, que eram qualitativamente idênticas uma à outra no início no desenvolvimento ontogénico, ou ocorre uma distinção, tal como uma célula muscular ou uma célula nervosa, entre células, ou o sistema biológico, em resultado, divide-se em partes ou sistemas parciais qualitativamente distinguíveis.

Como aqui se utiliza, a expressão "agente terapêutico celular" refere-se a um fármaco utilizado para fins de tratamento, diagnóstico e prevenção, que contém uma célula ou um tecido preparados através de isolamento a partir de seres humanos, cultura e operações específicas (como previsto pela US FDA). Especificamente, refere-se a um fármaco utilizado para fins de tratamento, diagnóstico e prevenção através de uma série de comportamentos *in vitro* de multiplicação e selecção de células autólogas, alogénicas e xenogénicas vivas ou alteração das características biológicas de células por outros meios com fins de recuperar as funções de células e tecidos. Os agentes terapêuticos celulares estão amplamente divididos, de acordo com o nível de diferenciação das células, em agentes terapêuticos de células somáticas e agentes terapêuticos de células estaminais. A presente invenção refere-se particularmente a um agente terapêutico celular contendo células estaminais derivadas da decídua.

2. Isolamento e purificação de células estaminais derivadas da decídua

A placenta é formada para um embrião durante a gravidez e tem geralmente o formato de um disco possuindo um peso de cerca de 500 g, um diâmetro de cerca de 15-20 cm e uma espessura de 2-3 cm. Um lado da placenta está em contacto com o corpo da mãe, e o outro lado está em contacto com um embrião. O espaço na placenta contém o sangue da mãe para fornecimento de nutrientes a um embrião. A placenta consiste em três camadas: o âmnio, o cório e a decídua. O âmnio é uma membrana fina transparente que envolve um embrião e contém fluido amniótico, e as células estaminais de um embrião estão presentes no âmnio. A decídua é uma membrana formada em

resultado de um processo em que as células epiteliais do útero são modificadas de modo a que um ovo fertilizado fique implantado na parede uterina. A decídua contém células estaminais da mãe. Na presente invenção, as células estaminais foram isoladas da decídua.

As células estaminais derivadas da decídua isoladas da placenta humana de termo de acordo com a presente invenção são classificadas como células estaminais adultas autólogas, que não levantam problemas éticos pois são derivadas de tecido da placenta.

As células estaminais são geralmente isoladas e purificadas a partir da decídua placentária através do seguinte método. Após expulsão da placenta de mamífero (preferivelmente placenta humana) do útero, a decídua é isolada da placenta, tratada e cultivada para produzir células estaminais multipotentes, células estaminais derivadas da decídua placentária e outros biomateriais. As células estaminais derivadas da decídua placentária são obtidas a partir da placenta expulsa do útero. Numa concretização preferida, a placenta é cultivada na presença de factores de crescimento, por exemplo, bFGF (Factor de Crescimento de Fibroblastos Básico).

Na presente invenção, as células estaminais foram isoladas e purificadas a partir de decídua placentária humana através do seguinte método. Os tecidos da decídua foram isolados de amostras de tecido placentário humano e foram lavados com PBS, e depois os tecidos da decídua são finamente cortados. Os tecidos de decídua finamente cortados foram transferidos para uma placa de 100 mm, e depois foram quimicamente degradados em DMEM (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco, Gibco) contendo colagenase (1 mg/ml), a 37°C durante 1 hora.

Os tecidos quimicamente decompostos foram filtrados através de um crivo de 100 µm para remover tecidos não decompostos, e depois foram centrifugados a 1200 rpm durante 1-10 minutos. O sobrenadante foi aspirado, e as peletes que permaneceram no fundo foram lavadas com PBS, e depois centrifugadas a 1200 rpm durante 1-10 minutos. As peletes que

permaneceram no fundo foram bem suspensas como células individuais, e depois foram cultivadas num meio DMEM contendo bFGF. Nesta altura, as células estaminais mesenquimatosas estavam fixadas ao fundo, e as outras células estavam suspensas.

Estas células estaminais derivadas da decídua placentária cresceram fixadas ao plástico e apresentavam características morfológicas de formato redondo e de fuso. Após dois dias, as células não fixadas ao fundo da placa foram lavadas com PBS e cultivadas substituindo o meio a intervalos de 2-3 dias, desse modo obtendo uma solução de células estaminais derivadas da decídua isoladas da placenta humana.

A velocidade de proliferação das células estaminais derivadas da decídua isoladas foi examinada e, em resultado, podia-se observar que essas células apresentavam um aumento gradual no CPDL até à passagem número 12, sugerindo que estas células tinham elevada velocidade de proliferação (FIG. 2).

As células estaminais derivadas da decídua placentária obtidas formam esferas em meio SFM, e assim podem ser mantidas num estado indiferenciado durante um longo período de tempo (FIG. 3). Um exemplo de meio SFM que se pode utilizar na presente invenção pode ser MEBM (meio basal epitelial mamário) contendo 2% de B27, 500 mM de 2-mercaptoetanol, 1 µg/ml de hidrocortisona, 5 µg/ml de insulina, 20 ng/ml de EGF e 20 ng/ml de bFGF.

O número e tipo de células proliferadas podem ser facilmente monitorizados medindo as alterações na morfologia e marcadores da superfície celular utilizando técnicas padrão de detecção celular tais como citometria de fluxo, selecção celular, imunocitoquímica (*e.g.*, coloração com anticorpos específicos de tecidos ou específicos de marcadores celulares), selecção celular activada por fluorescência (FACS), selecção celular activada magneticamente (MACS), ou por exame da morfologia das células utilizando um microscópio óptico ou um microscópio confocal, ou medindo as alterações na expressão génica utilizando técnicas bem conhecidas na especialidade, tais como PCR e determinação de perfis de expressão génica.

Numa concretização preferida, as células estaminais derivadas da decídua da placenta ou do fluido menstrual são seleccionadas utilizando técnicas conhecidas na especialidade, por exemplo, centrifugação em gradiente de densidades, separação magnética de células, citometria de fluxo e outros métodos de separação de células.

Os métodos para obtenção de células estaminais multipotentes que expressam os antigénios de superfície pretendidos a partir de caldo de células estaminais derivadas da decídua da placenta ou do fluido menstrual obtidas acima incluem um método de FACS utilizando um citómetro de fluxo com função de selecção (*Int. Immunol.*, 10(3):275, 1998), um método utilizando contas magnéticas e um método de selecção (“*panning*“) utilizando um anticorpo que reconhece especificamente células estaminais multipotentes (*J Immunol.*, 141(8):2797, 1998). Igualmente, os métodos para obtenção de células estaminais multipotentes a partir de uma grande quantidade de caldo de cultura incluem um método onde anticorpos que reconhecem especificamente moléculas expressas na superfície de células (aqui adiante, referidas como "antigénios de superfície") são utilizados isoladamente ou em combinação na forma de colunas.

Os métodos de selecção por citometria de fluxo podem incluir um método de carga de gotas de água e um método de captura de células. Numa concretização, anticorpos específicos para marcadores da superfície celular, ou ligandos, são marcados com marcadores fluorescentes distintos. As células são processadas através de um seleccionador de células, que permite a separação de células com base na sua capacidade para se ligarem aos anticorpos utilizados. As partículas seleccionadas por FACS podem ser directamente depositadas em poços individuais de placas de 96 poços ou de 384 poços para facilitar a separação e a clonagem.

Em qualquer destes métodos, um anticorpo que reconhece especificamente um antigénio na superfície celular é marcado com fluorescência e a intensidade de fluorescência emitida por um anticorpo ligado à molécula expressa na superfície da célula é convertida num sinal eléctrico, através do que a

quantidade expressa do antigénio pode ser quantificada. É igualmente possível separar as células que expressam uma pluralidade de antigénios de superfície por combinação de tipos de fluorescência para isso utilizados. Os exemplos de fluorescências que podem ser utilizadas neste caso incluem FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), APC (alo-ficocianina), TR (Vermelho do Texas), Cy 3, CyChrome, Vermelho 613, Vermelho 670, TRI-Color, Quantum Red, etc.

Os métodos de FACS que utilizam um citómetro de fluxo incluem: um método em que é recolhido o caldo de células estaminais anterior, a partir do qual as células são isoladas, por exemplo, por centrifugação, e coradas directamente com anticorpos; e um método em que as células são cultivadas e crescidas num meio adequado e depois coradas com anticorpos. A coloração de células é realizada misturando um anticorpo primário que reconhece um antigénio de superfície com uma amostra de células alvo e incubando a mistura a 4°C durante 30 minutos a 1 hora. Quando o anticorpo primário está marcado por fluorescência, as células são isoladas com um citómetro de fluxo após lavagem. Quando o anticorpo primário não está marcado por fluorescência, as células que reagiram com o anticorpo primário e um anticorpo secundário marcado por fluorescência possuindo actividade de ligação relativamente ao anticorpo primário são misturados após lavagem, e incubados a 4°C for 30 minutos a 1 hora. Após lavagem, as células coradas com os anticorpos primário e secundário são isoladas com um citómetro de fluxo.

3. Características de células estaminais derivadas de decídua placentária

As células estaminais isoladas da decídua placentária são homogéneas e estéreis. Adicionalmente, as células estaminais são prontamente obtidas numa forma adequada para administração a seres humanos, ou seja, são de qualidade farmacêutica.

Após cultura de longo prazo, as células podem ser caracterizadas com a série CD de marcadores de antigénios de superfície, por exemplo, CD29 (marcador de células mononucleares), CD31 (marcador de células endoteliais e de células estaminais), CD45 (marcador de células

hematopoiéticas) e CD90 (marcador de células estaminais mononucleares), e podem ser aplicadas a análise FACS.

As células estaminais derivadas da decídua placentária preferidas obtidas pelo método da presente invenção podem ser identificadas pela presença de marcadores da superfície celular possuindo as seguintes características: apresentando imunofenótipos positivos para CD29 e CD90, mas negativos para CD31 e CD45. Estes marcadores da superfície celular são determinados rotineiramente de acordo com métodos bem conhecidos na especialidade, *e.g.* por citometria de fluxo, seguida de lavagem e coloração com um anticorpo anti-marcador da superfície celular.

Igualmente, as células estaminais derivadas da decídua placentária de acordo com a presente invenção podem ser identificadas utilizando marcadores Oct4, SSEA4 e Cripto-1 que podem ser considerados como um marcador indiferenciado para células estaminais (FIG. 4, 5 e 6). O Oct4 é bem conhecido como um marcador indiferenciado para células estaminais, e é genérico para testar a capacidade de expressão de Oct4 de modo a identificar células estaminais num estado indiferenciado, como divulgado no Pedido de Patente Coreana N.º 10-2004-0105716, intitulado "Monoclonal antibody specific to human embryonic stem cells", no Pedido de Patente Coreana N.º 10-2004-0096780, intitulado "Double-stranded RNA for inhibition of expression of Oct4 gene that maintains undifferentiated state of mammal embryonic stem cells", no Pedido de Patente Coreana N.º 10-2006-0092128, intitulado "Human umbilical cord blood-derived multipotent stem cells having increased ability to proliferate due to osteoblast-based structure and preparation method thereof", e similares. Igualmente, é bem conhecido que o SSEA4 (antigénio 4 embrionário específico do estádio) e o Cripto-1 estão presentes na superfície de células estaminais embrionárias humanas.

A expressão de Oct4 é confirmada utilizando RT-PCR (do inglês "Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction", reacção em cadeia pela polimerase com transcritase inversa) juntamente com FACS. O método de RT-PCR é uma técnica conhecida na especialidade. A RT-PCR é uma técnica compreendendo a síntese do ADNc correspondente utilizando ARN

de uma região específica como molde e a realização de amplificação por PCR utilizando o ADNc, e que consiste nos passos de (1) preparação de ADNc a partir de ARN utilizando transcritase inversa, e (2) amplificação de uma região específica utilizando o ADNc, e o passo (2) é o mesmo que um método de amplificação de uma região génica específica a partir de ADN genómico. Este método pode ser realizado de uma maneira simples comparativamente com a análise de ARN que tem sido possível através de métodos tais como hibridação *Northern blot*, e permite determinar a sequências de bases de um gene. Assim, este método é muito útil principalmente no estudo da sequência de bases e ao nível de transcrição do ARNm.

As células estaminais derivadas da decídua placentária da presente invenção são positivas para a expressão de Oct4, SSEA4 e Cripto-1 (FIG. 4, 5 e 6).

4. Diferenciação de células estaminais derivadas de decíduas placentárias

As células estaminais derivadas da decídua placentária obtidas de acordo com o método da invenção podem ser induzidas a diferenciar-se segundo linhagens celulares específicas, incluindo a diferenciação em miócitos. Numa concretização específica, as células estaminais derivadas da decídua placentária obtidas de acordo com o método da invenção são induzidas a diferenciar-se para utilização em transplantação e protocolos de tratamento *ex vivo*. Numa concretização específica, as células estaminais derivadas da decídua placentária obtidas de acordo com o método da invenção são induzidas a diferenciar-se num tipo de células particular e são geneticamente manipuladas para proporcionar um produto génico terapêutico.

A diferenciação das células estaminais derivadas da decídua placentária em miócitos particulares pode ser medida de acordo com qualquer método conhecido na especialidade, e as células estaminais derivadas da decídua placentária podem ser induzidas a diferenciar-se em miócitos através de pré-tratamento das células estaminais da decídua placentária com azacitidina durante um dia e depois cultura das células pré-tratadas em meio SKBM (Cambrex, Co.).

A determinação se as células estaminais se diferenciaram em miócitos pode ser realizada por métodos bem conhecidos na especialidade, *e.g.*, mediando as alterações na morfologia e marcadores da superfície celular (*e.g.*, coloração das células com anticorpos específicos de tecidos ou específicos de marcadores celulares) utilizando técnicas tais como citometria de fluxo ou imunocitoquímica, ou examinando a morfologia das células utilizando um microscópio óptico ou um microscópio confocal, ou medindo as alterações na expressão génica utilizando técnicas bem conhecidas na especialidade, tais como PCR e determinação de perfis de expressão génica.

5. Utilização de células estaminais derivadas de decíduas placentárias e células a partir delas diferenciadas

As células estaminais derivadas da decídua placentária de acordo com a presente invenção podem ser utilizadas para uma ampla variedade de protocolos terapêuticos em que o tecido ou o órgão do corpo é aumentado, reparado ou substituído pelo enxerto, transplantação ou infusão de uma população celular desejada, tal como uma célula estaminal derivada da decídua placentária ou população de células estaminais derivadas da decídua placentária. As células estaminais derivadas da decídua placentária da presente invenção podem ser utilizadas para substituir ou aumentar tecidos existentes para crescer tecidos novos ou alterados, ou para ligar os tecidos a tecidos ou estruturas biológicos.

Numa concretização preferida da presente invenção, as células estaminais derivadas da decídua placentária podem ser utilizadas em transplantes autólogos e alogénicos, incluindo transplantações hematopoiéticas com correspondência de HLA e sem correspondência de HLA.

As células estaminais derivadas da decídua placentária da presente invenção podem ser utilizadas em vez de classes específicas de células progenitoras (*e.g.*, condrócitos, células estaminais, células hematopoiéticas, células parenquimatosas pancreáticas, neuroblastos, células progenitoras musculares, etc.) em protocolos terapêuticos ou de investigação em que seriam tipicamente utilizadas células progenitoras.

Em adição, as células estaminais derivadas da decídua placentária da presente invenção podem ser formuladas na forma de preparações injectáveis (*e.g.*, WO 96/39101 aqui incorporado por referência na sua totalidade). Numa concretização alternativa, as células e os tecidos da presente invenção podem ser formulados utilizando hidrogéis polimerizáveis ou reticulados como descrito em US 5,709,854, 5,516,532 e 5,654,381, cada um aqui incorporado por referência na sua totalidade.

6. Desenvolvimento de um agente para o tratamento de incontinência urinária contendo células estaminais derivadas da decídua placentária

O agente terapêutico celular da invenção para o tratamento de incontinência urinária, contendo células estaminais derivadas da decídua placentária, é baseado no princípio de que as células estaminais derivadas da decídua placentária aumentam a pressão de perda urinária, indicando uma melhoria na função do esfíncter uretral interno, e aumentam a contractilidade do esfíncter uretral, indicando uma melhoria na função do esfíncter uretral externo.

Como aqui se utiliza, a expressão "pressão de perda urinária" refere-se à pressão intravesical no momento da perda de urina ou pressão de perda urinária de Valsalva, e a diminuição na pressão de perda urinária é uma causa importante da incontinência urinária.

Na presente invenção, de modo a medir o efeito das células estaminais derivadas da decídua placentária no tratamento da incontinência urinária, particularmente na pressão de perda urinária, ratinhos nus fêmea foram divididos em um grupo normal, um grupo de controlo e grupos experimentais. Depois, foi aumentada a pressão intravesical em cada um do grupo normal, do grupo de controlo (em que o nervo pudendo foi cortado) e dos grupos experimentais (em que o nervo pudendo foi cortado, e depois injectado com as células estaminais derivadas da decídua placentária ou células estaminais derivadas de tecido adiposo), e foi medida a pressão de perda urinária em cada grupo. Em resultado, foi confirmado que as células estaminais derivadas da decídua placentária de acordo com a presente invenção aumentam a

pressão de perda urinária, e assim podem ser utilizadas como um agente para o tratamento de incontinência urinária.

O músculo uretral do esfíncter funciona para regular a micção devido à sua contractilidade, e o enfraquecimento do músculo uretral do esfíncter é também uma causa importante da incontinência urinária.

Na presente invenção, de modo a medir o efeito das células estaminais derivadas da decídua placentária no tratamento de incontinência urinária, particularmente na contractilidade do esfíncter uretral, ratinhos machos foram divididos em um grupo normal, um grupo de controlo e grupos experimentais. Depois, foi aplicada estimulação com campo eléctrico ou com um fármaco de acetilcolina ao segmento de tecido uretral de cada grupo, e foi medida a contractilidade do esfíncter uretral em cada grupo. Em resultado, foi confirmado que as células estaminais derivadas da decídua placentária de acordo com a presente invenção aumentaram a contractilidade do esfíncter uretral, e assim podem ser utilizadas como um agente terapêutico celular para o tratamento de incontinência urinária.

7. Agente terapêutico celular para o tratamento de incontinência urinária contendo células estaminais derivadas de decídua placentária, ou células estaminais derivadas de decídua de fluido menstrual

Como aqui se utiliza, a expressão "decídua placentária" refere-se a uma membrana formada em resultado de um processo em que as células epiteliais do útero são modificadas de modo a que um ovo fertilizado fique implantado na parede uterina.

Como aqui se utiliza, o fluido menstrual contém muco cervical, descarga vaginal, células uterinas, células epiteliais uterinas e sangue de vasos capilares e é principalmente composto por proteínas que formam células e similares. Aqui, as células epiteliais uterinas expelidas do útero e contidas no fluido menstrual são referidas como "a decídua do fluido menstrual".

Como descrito acima, a decídua placentária e a decídua do fluido menstrual são principalmente compostas por células

epiteliais uterinas. Nos Exemplos da presente invenção, apenas o efeito terapêutico sobre a incontinência urinária das células estaminais derivadas da decídua placentária foi especificamente demonstrado, mas pode ser prontamente inferido as células estaminais derivadas da decídua do fluido menstrual também têm o efeito de tratamento da incontinência urinária. Portanto, será óbvio para um perito na especialidade que a presente invenção torna possível realizar não apenas um agente terapêutico celular para o tratamento de incontinência urinária contendo células estaminais derivadas da decídua placentária, como também um agente terapêutico celular para o tratamento de incontinência urinária contendo células estaminais derivadas da decídua do fluido menstrual.

Exemplos

Adiante, a presente invenção será descrita com mais detalhes com referência aos exemplos. Deve entender-se, contudo, que estes exemplos são para fins ilustrativos apenas e não se pretende com eles limitar o âmbito da presente invenção.

Exemplo 1: Isolamento e cultura de células estaminais de acordo com a presente invenção

Isolamento e cultura de células estaminais derivadas da decídua placentária

A decídua foi isolada da placenta da seguinte maneira de acordo com o método descrito na Publicação de Patente Coreana N.º 10-2007-0101756A apresentada no nome da requerente. Especificamente, as placentas foram recolhidas de partos normais e de partos prematuros no Guro Hospital, Korea University Medical Center, de acordo com as orientações Institutional Review Board Guidelines of Korea University Medical Center e foram utilizadas para fins de investigação. Os tecidos placentários foram transferidos para o laboratório num estado em que estavam contidos em solução salina fisiológica contendo um antibiótico. Os tecidos placentários transferidos para o laboratório foram lavados com PBS para remover células sanguíneas e vários outros tecidos, ou os tecidos foram tratados com tampão de hemólise para remover células sanguíneas, ou cada um dos tecidos do âmnio, do cório,

da decídua e do leito placentário que constituem a placenta foi cuidadosamente isolado utilizando fórceps.

Cada um dos tecidos da decídua isolados foi colocado numa placa de 100 mm e finamente cortado com uma tesoura esterilizada numa dimensão de 1-2 mm. Depois, o tecido cortado foi colocado num meio contendo colagenase e foi incubado numa incubadora a 37°C durante 1-4 horas, após o que os tecidos tratados com colagenase foram filtrados através de uma tela de arame de 100 mesh. As células assim isoladas foram colocadas num balão de 75 e cultivadas em DMEM contendo bFGF a 37°C numa condição de 5% de CO_2 (FIG. 1).

Exemplo 2: Exame da velocidade de proliferação de células estaminais derivadas da decídua placentária

Examinou-se a velocidade de proliferação das células estaminais obtidas de acordo com o método de proliferação acima descrito das células estaminais multipotentes derivadas de tecido da decídua placentária humana. As células estaminais derivadas da decídua placentária resultantes das amostras de tecido da decídua placentária de diferentes indivíduos humanos foram obtidas através do método de isolamento descrito no Exemplo 1, e depois foram semeadas num balão de 75 numa densidade de $2x10^5$ células.

O CPDL é um índice indicativo da velocidade de proliferação de células e é expresso segundo a equação seguinte:

$$CPDL = \ln(Nf/Ni)/\ln 2$$

em que, Ni: o número inicial de células semeadas; e Nf: o número final de células.

O CPDL das células estaminais derivadas da decídua foi observado de acordo com o número de passagens e, em resultado, as células apresentaram um valor de CPDL de cerca de 30 na passagem 12. Este valor de CPDL foi similar ao de células estaminais derivadas de tecido adiposo humano (Lin *et al.*, *Stem Cells and Development*, 14:92, 2005; Zuk *et al.*, *Tissue eng.*, 7:211, 2001). Estes resultados sugerem que as células estaminais derivadas da decídua placentária de acordo com a

presente invenção possuem uma velocidade de proliferação muito elevada (FIG. 2).

Exemplo 3: Características imunológicas de células estaminais multipotentes derivadas da decídua placentária

As células estaminais multipotentes derivadas da decídua placentária obtidas no Exemplo 1 foram lavadas com PBS e tratadas com tripsina. Depois, as células foram recolhidas e centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos. Após o sobrenadante ser descartado, as células foram suspensas em PBS e dispensadas em cada poço numa densidade celular de 1×10^5 células. Um anticorpo (anticorpo monoclonal anti-humano de ratinho conjugado com R-ficoeritrina) foi colocado em cada poço, e as células foram incubadas a 4°C durante 40 minutos. Após a incubação, o caldo celular foi centrifugado a 1000 rpm durante 5 minutos. Após o sobrenadante ser removido, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos. Depois, após o sobrenadante ser removido, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. Após o sobrenadante ser removido, as células foram fixadas com paraformaldeído a 1% e foram analisadas utilizando um citómetro de fluxo. Em resultado da análise das características imunológicas das células estaminais derivadas da decídua placentária de acordo com a presente invenção, como se pode observar na Tabela 1, as células apresentaram imunofenótipos positivos para CD29, CD90, Oct-4, SSEA-4 e Cripto-1, mas negativos para CD31 e CD45 (FIG. 4).

Tabela 1: Análise de antigénios de superfície (análise FACS) de células estaminais derivadas da decídua placentária

Antigénio	MSC da Decídua
CD29	+
CD31	-
CD45	-
CD90	+
Oct-4	+
SSEA-4	+
Cripto-1	+

Exemplo 4: Análise da expressão de Oct4 e SSEA-4 de células estaminais multipotentes derivadas da decídua placentária

As células estaminais derivadas da decídua placentária obtidas no Exemplo 1 foram lavadas três vezes com PBS e fixadas com PBS contendo paraformaldeído a 4% durante 30 minutos. Após lavagem três vezes com PBS, as células foram permeabilizadas com PBS contendo Triton-X100 a 0,1% durante 10 minutos. Após lavagem três vezes com PBS, as células foram tratadas com tampão de bloqueio (soro de cabra a 5%) e incubadas a 4°C durante uma hora, e depois deixaram-se reagir com um tampão de bloqueio contendo um anticorpo primário durante a noite. Após lavagem três vezes com PBS, as células foram deixadas reagir com um anticorpo secundário numa sala escura durante 1 hora. Após lavagem três vezes com PBS, as células foram montadas. Em resultado, como mostrado na FIG. 5, as células estaminais multipotentes de acordo com a presente invenção foram positivas para Oct4 e SSEA-4 que são marcadores para células estaminais embrionárias humanas.

Igualmente, a expressão de Oct4 foi analisada utilizando RT-PCR. A reacção com RT foi realizada durante 50 minutos a 37°C e 10 minutos a 70°C, e a reacção PCR foi realizada durante 5 minutos a 95°C, e 40 ciclos, cada um consistindo em 30 s a 95°C, 40 s a 58°C e 1 min a 72°C, e depois 10 minutos a 72°C. Em resultado, como mostrado na FIG. 6, podia observar-se que as células estaminais derivadas da decídua eram expressas a 800 pb.

Exemplo 5: Diferenciação em miócitos de células estaminais multipotentes derivadas de decídua placentária.

As células estaminais multipotentes derivadas de decídua placentária obtidas no Exemplo 1 foram dispensadas num balão revestido com fibronectina a 10 ng/ml, e depois foram pré-tratadas com 5'-azacitidina a 10 μM durante 24 horas. Após o pré-tratamento, as células foram cultivadas em SKBM (Cambrex, Co.) durante 10 dias, seguindo-se imunocoloração.

Em resultado, as células estaminais multipotentes derivadas de tecido da placenta de acordo com a presente invenção foram positivas para miosina, que é um antigénio específico de células musculares. Este resultado sugere que as

células estaminais multipotentes derivadas de tecido de placenta humana de acordo com a presente invenção se diferenciaram em miócitos (FIG. 7).

Exemplo 6: Medição da pressão de perda urinária em ratinhos nus fêmea injectados com células estaminais derivadas da decídua placentária

(1) Preparação do modelo animal experimental

Para medir o efeito da células estaminais derivadas da decídua placentária sobre a pressão de perda urinária, utilizaram-se 56 ratinhos nus fêmea. Os ratinhos nus fêmea foram divididos em um grupo normal (n=14), um grupo de controlo (n=14; em que o nervo pudendo foi cortado), um grupo experimental 1 (n=14; injectado com 10^5 células estaminais derivadas da decídua placentária 2 semanas após o nervo pudendo ser cortado) e um grupo experimental 2 (n=14; injectado com 10^7 células estaminais derivadas da decídua placentária 2 semanas após o nervo pudendo ser cortado). Cada um dos grupos foi subdividido em um grupo de 4 semanas (n=7) e um grupo de 8 semanas (n=7) e mediu-se a pressão de perda urinária às 4 semanas e às 8 semanas.

Preparação do grupo de controlo: 14 ratinhos nus fêmea foram anestesiados com halotano, e a fossa isquiorrectal foi bissectada bilateralmente para seccionar transversalmente o nervo pudendo. Depois, o nervo pudendo foi electrocauterizado em cerca de 2 cm, e depois a pele foi suturada.

Preparação dos grupos experimentais 1 e 2: 28 ratinhos nus fêmea foram anestesiados com halotano, o abdómen foi aberto através de uma incisão abaixo da linha média, e depois destacaram-se a bexiga e a uretra (FIG. 8). Após ocorrer incontinência urinária 2 semanas depois do seccionamento transversal do nervo pudendo, 10^5 células estaminais derivadas da decídua placentária obtidas no Exemplo 1 foram injectadas em 14 ratinhos através de uma seringa Hamilton de 10 ml utilizando um microscópio (grupo experimental 1), e os outros 14 ratinhos foram injectados com 10^7 células (grupo experimental 2).

(2) Medição da pressão de perda urinária

Os ratinhos nus fêmea foram anestesiados com uretano (1,2 g/kg), e a medula espinal foi seccionada transversalmente ao nível da T9-T10. Depois, o abdómen foi aberto através de uma incisão abaixo da linha média para destacar a bexiga, e depois a bexiga foi submetida a cistostomia suprapúbica utilizando um cateter PE-90.

Para a medição da pressão de perda urinária, os ratinhos nus fêmea de cada um de o grupo normal, o grupo de controlo e os grupos experimentais, foram colocados na plataforma basculante vertical/modelo de grampeamento da pressão intravesical (FIG. 9). Ligaram-se 150 ml de solução salina fisiológica a um tubo PE-90, e aumentou-se a altura da solução salina ligeiramente de cada vez para aumentar a pressão intravesical dos ratinhos da experiência. A pressão registada no início da perda de urina foi definida como a LPP (pressão de perda urinária).

Como mostrado na FIG. 10, o grupo normal (N), o grupo de controlo (D), o grupo experimental 1 (P1) e o grupo experimental 2 (P2) apresentaram pressões de perda urinária de 22,8 ± 0,9, 11,6 ± 0,6, 20,4 ± 0,8 e 21,5 ± 0,9 cmH_2O, respectivamente, a 4 semanas (FIG. 10A), e apresentaram pressões de perda urinária de 22,6 ± 0,8, 11,5 ± 0,7, 20,6 ± 0,6 e 22,5 ± 0,8 cmH_2O, respectivamente, a 8 semanas (FIG. 10B). Assim, tanto a 4 semanas como a 8 semanas, as pressões de perda urinária do grupo normal e dos grupos experimentais 1 e 2 foram estatisticamente superiores às do grupo de controlo, e a pressão de perda urinária do grupo de controlo foi inferior à do grupo normal. Assim, nos grupos experimentais 1 e 2 administrados com as células estaminais derivadas da decídua placentária preparada no Exemplo 1, as pressões de perda urinária foram diminuídas para um nível similar ao do grupo normal, sugerindo que as células estaminais derivadas de decíduas placentárias funcionaram para aumentar a pressão de perda urinária.

Exemplo 7: Medição da pressão de perda urinária em ratinhos nus fêmeas injectados com células estaminais derivadas de tecido adiposo (exemplo de referência; não faz parte do âmbito da presente invenção)

(1) Preparação do modelo animal experimental

Para medir o efeito das células estaminais derivadas de tecido adiposo sobre a pressão de perda urinária, utilizaram-se 56 ratinhos nus fêmea. Os ratinhos nus fêmea foram divididos em um grupo normal (n=14), um grupo de controlo (n=14; no qual o nervo pudendo foi cortado), um grupo experimental 1 (n=14; injectado com 10^5 células estaminais derivadas de tecido adiposo 2 semanas depois do nervo pudendo ser cortado) e um grupo experimental 2 (n=14; injectado com 10^7 células estaminais derivadas de tecido adiposo 2 semanas depois do nervo pudendo ser cortado). Cada um dos grupos foi subdividido num grupo de 4 semanas (n=7) e num grupo de 8 semanas (n=7) e mediu-se a pressão de perda urinária às 4 semanas e às 8 semanas.

Preparação do grupo de controlo: 14 ratinhos nus fêmea foram anestesiados com halotano, e a fossa isquiorrectal foi bissectada bilateralmente para seccionar transversalmente o nervo pudendo. Depois, o nervo pudendo foi electrocauterizado em cerca de 2 cm, e depois a pele foi suturada.

Preparação dos grupos experimentais 1 e 2: 28 ratinhos nus fêmea foram anestesiados com halotano, o abdómen foi aberto através de uma incisão abaixo da linha média, e depois destacaram-se a bexiga e a uretra (FIG. 8). Após ocorrer incontinência urinária 2 semanas depois do seccionamento transversal do nervo pudendo, 10^5 células estaminais derivadas de tecido adiposo obtidas no Exemplo 1 foram injectadas em 14 ratinhos através de uma seringa Hamilton de 10 ml utilizando um microscópio (grupo experimental 1), e os outros 14 ratinhos foram injectados com 10^7 células (grupo experimental 2).

(2) Medição da pressão de perda urinária

Os ratinhos nus fêmea foram anestesiados com uretano (1,2 g/kg), e a medula espinal foi seccionada tranversalmente ao nível da T9-T10. Depois, o abdómen foi aberto através de

uma incisão abaixo da linha média para destacar a bexiga, e depois a bexiga foi submetida a cistostomia suprapúbica utilizando um cateter PE-90.

Para a medição da pressão de perda urinária, os ratinhos nus fêmea de cada um de o grupo normal, o grupo de controlo e os grupos experimentais, foram colocados na plataforma basculante vertical/modelo de grampeamento da pressão intravesical (FIG. 9). Ligaram-se 150 ml de solução salina fisiológica a um tubo PE-90, e aumentou-se a altura da solução salina ligeiramente de cada vez para aumentar a pressão intravesical dos ratinhos da experiência.

A pressão registada no início da perda de urine foi definida como a LPP (pressão de perda urinária).

Como mostrado na FIG. 11, as pressões de perda urinária do grupo normal (N), do grupo de controlo (D), do grupo experimental 1 (A1) e do grupo experimental 2 (A2) foram 22,8 ± 0,9, 11,6 ± 0,7, 18,7 ± 0,9 e 19,2 ± 0,7 cmH_2O, respectivamente, a 4 semanas ("A" da FIG. 11), e mostrou-se que eram de 22,6 ± 0,9, 11,5 ± 0,7, 20,4 ± 0,7 e 21,5 ± 0,8 cmH_2O, respectivamente, a 8 semanas ("B" da FIG. 11). Assim, pôde ser confirmado que, nos grupos experimentais A1 e A2 administrados com as células estaminais derivadas de tecido adiposo da presente invenção, a pressão de perda urinária foi aumentada tanto às 4 semanas como às 8 semanas. Igualmente, a pressão de perda urinária do grupo A2 foi superior à do grupo A1, mas não houve diferença estatística entre elas (FIG. 11).

Exemplo 8: Medição da contractilidade do esfíncter uretral em ratinhos machos injectados com células estaminais derivadas da decídua placentária

(1) Preparação do modelo animal experimental

Para medir a influência das células estaminais derivadas da decídua placentária sobre a contractilidade do esfíncter uretral, utilizaram-se 56 ratinhos machos. Os ratinhos machos foram divididos em um grupo normal (n=14), um grupo de controlo (n=14; em que o nervo pudendo foi seccionado transversalmente), um grupo experimental 1 (n=14; injectado

com 10^5 células estaminais derivadas da decídua placentária 2 semanas após o nervo pudendo ser cortado) e um grupo experimental 2 (n=14; injectado com 10^7 células estaminais derivadas da decídua placentária 2 semanas após o nervo pudendo ser cortado). Cada um dos grupos foi subdividido em um grupo de 4 semanas (n=7) e um grupo de 8 semanas (n=7) e mediu-se a contractilidade do esfíncter uretral às 4 semanas e às 8 semanas.

Preparação do grupo de controlo: 14 ratinhos machos foram anestesiados com halotano, e a fossa isquiorrectal foi bissectada bilateralmente para seccionar transversalmente o nervo pudendo. Depois, o nervo pudendo foi electrocauterizado em cerca de 2 cm, e depois a pele foi suturada.

Preparação dos grupos experimentais 1 e 2: 28 ratinhos machos foram anestesiados com halotano, a região do abdómen foi aberta através de uma incisão abaixo da linha média, e depois a bexiga e a uretra foram seccionadas transversalmente (FIG. 8). Após ocorrer incontinência urinária 2 semanas depois do seccionamento transversal do nervo pudendo, 10^5 células estaminais derivadas da decídua placentária obtidas no Exemplo 2 foram injectadas em 14 ratinhos através de um seringa Hamilton de 10 ml utilizando um microscópio (grupo experimental 1), e os outros 14 ratinhos foram injectados com 10^7 células (grupo experimental 2).

(2) Medição da contractilidade do esfíncter uretral

Após ser obtida a uretra de cada um dos ratinhos machos, a uretra foi cortada em espiral, preparando-se desse modo secções de tecido uretral (10×2 mm). Numa experiência com banho de órgãos, uma câmara vertical (volume de 20 ml) foi perfundida com CO_2/ solução Tyrode tamponada com bicarbonato, e depois as secções de tecido uretral foram fixadas na câmara. Depois, examinou-se a contractilidade do esfíncter uretral nas secções de tecido uretral utilizando acetilcolina (FIG. 12).

Em resultado, como mostrado na FIG. 13, quando a estimulação com campo eléctrico (EFS, 60V), que é convencionalmente utilizada no estado da técnica, foi realizada na experiência com ratinhos machos, os valores da contracção do esfíncter uretral no grupo normal (N), no grupo

de controlo (D), no grupo experimental 1 (P1) e no grupo experimental 2 (P2) foram 0,45 ± 0,06, 0,34 ± 0,02, 0,39 ± 0,02 e 0,45 ± 0,05 g/tensão, respectivamente, a 4 semanas, e foram 0,44 ± 0,06, 0,35 ± 0,02, 0,41 ± 0,04 e 0,46 ± 0,03 g/tensão, respectivamente, a 8 semanas. Deste modo, nas experiências de estimulação com campo eléctrico, os grupos experimentais apresentaram contractilidade do esfíncter uretral superior à do grupo de controlo em ambas as semanas e às 8 semanas e apresentaram contractilidade do esfíncter uretral similar ou superior à do grupo normal. Em adição, o grupo experimental 2 apresentou contractilidade do esfíncter uretral superior à do grupo experimental 1.

Entretanto, como mostrado na FIG. 14, quando as amostras de teste foram tratadas com acetilcolina (Ach), os valores de contracção do esfíncter uretral no grupo normal (N), no grupo de controlo (D), no grupo experimental 1 (P1) e no grupo experimental 2 (P2) foram 0,54 ± 0,04, 0,28 ± 0,03, 0,52 ± 0,02 e 0,54 ± 0,03 g/tensão, respectivamente, a semanas (FIG. 14A), e foram 0,56 ± 0,03, 0,3 ± 0,02, 0,56 ± 0,04 e 0,59 ± 0,04 g/tensão, respectivamente, a 8 semanas (FIG. 14B). Deste modo, quando foi administrada acetilcolina, a contractilidade do esfíncter uretral foi superior em todos de o grupo normal e os grupos experimentais 1 e 2, relativamente à do grupo D, e o grupo experimental 2 apresentou contractilidade do esfíncter uretral superior à do grupo experimental 1, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre eles. Por outras palavras, não se pode concluir que o grupo experimental 2 apresentou contractilidade do esfíncter uretral superior à do grupo experimental 1.

Exemplo 9: Medição da contractilidade do esfíncter uretral em ratinhos machos administrados com células estaminais derivadas de tecido adiposo (exemplo de referência; não faz parte do âmbito da presente invenção)

(1) Preparação de modelo animal experimental

Para medir a influência das células estaminais derivadas de tecido adiposo sobre a contractilidade do esfíncter uretral, utilizaram-se 56 ratinhos machos. Os ratinhos machos foram divididos em um grupo normal (n=14), um grupo de controlo (n=14; em que o nervo pudendo foi seccionado

transversalmente), um grupo experimental 1 (n=14; injectado com 10^5 células estaminais derivadas de tecido adiposo 2 semanas após o nervo pudendo ser cortado) e um grupo experimental 2 (n=14; injectado com 10^7 células estaminais derivadas de tecido adiposo 2 semanas após o nervo pudendo ser cortado). Cada um dos grupos foi subdividido num grupo de 4 semanas (n=7) e num grupo de 8 semanas (n=7) e mediu-se a contractilidade do esfíncter uretral às 4 semanas e às 8 semanas.

Preparação do grupo de controlo: 14 ratinhos machos foram anestesiados com halotano, e a fossa isquiorrectal foi bissectada bilateralmente para seccionar transversalmente o nervo pudendo. Depois, o nervo pudendo foi electrocauterizado em cerca de 2 cm, e depois a pele foi suturada.

Preparação dos grupos experimentais 1 e 2: 28 ratinhos machos foram anestesiados com halotano, a região do abdómen foi aberta através de uma incisão abaixo da linha média, depois a bexiga e a uretra foram seccionadas transversalmente (FIG. 8). Após ocorrer incontinência urinária 2 semanas depois do seccionamento transversal do nervo pudendo, 10^5 células estaminais derivadas de tecido adiposo obtidas no Exemplo 1 foram injectadas em 14 ratinhos através de uma seringa Hamilton de 10 ml utilizando um microscópio (grupo experimental 1), e os outros 14 ratinhos foram injectados com 10^7 células (grupo experimental 2).

(2) Medição da contractilidade do esfíncter uretral

Após ser obtida a uretra de cada um dos ratinhos machos, a uretra foi cortada em espiral, preparando-se desse modo secções de tecido uretral (10×2 mm). Numa experiência com banho de órgãos, uma câmara vertical (volume de 20 ml) foi perfundida com CO_2/ solução Tyrode tamponada com bicarbonato, e depois as secções de tecido uretral foram fixadas na câmara. Depois, examinou-se a contractilidade do esfíncter uretral nas secções de tecido uretral utilizando acetilcolina (FIG. 12).

Em resultado, como mostrado na FIG. 15, quando a estimulação com campo eléctrico (EFS, 60V), que é convencionalmente utilizada no estado da técnica, foi realizada na experiência com ratinhos machos, os valores da

contracção do esfíncter uretral no grupo normal (N), no grupo de controlo (D), no grupo experimental 1 (A1) e no grupo experimental 2 (A2) foram 0,46 ± 0,08, 0,32 ± 0,03, 0,35 ± 0,03 e 0,38 ± 0,03 g/tensão, respectivamente, a 4 semanas, e foram 0,44 ± 0,06, 0,31 ± 0,02, 0,39 ± 0,02 e 0,44 ± 0,05 g/tensão, respectivamente, a 8 semanas. Deste modo, nas experiências de estimulação com campo eléctrico, a contractilidade do esfíncter uretral foi superior nos grupos N e A do que no grupo D em ambas as semanas e às 8 semanas e não houve diferença entre o grupo A2 e o grupo A1.

Entretanto, como mostrado na FIG. 16, quando as amostras de teste foram administradas com acetilcolina (Ach), os valores de contracção do esfíncter uretral no grupo normal (N), no grupo de controlo (D), no grupo experimental 1 (A1) e no grupo experimental 2 (A2) foram 0,54 ± 0,05, 0,29 ± 0,04, 0,48 ± 0,03 e 0,51 ± 0,05 g/tensão, respectivamente, a 4 semanas, e foram 0,55 ± 0,05, 0,29 ± 0,03, 0,55 ± 0,02 e 0,54 ± 0,05 g/tensão, respectivamente, a 8 semanas. Deste modo, quando foi administrada acetilcolina, a contractilidade do esfíncter uretral foi superior no grupo normal e nos grupos experimentais 1 e 2 do que no grupo D e não havia diferença entre o grupo A2 e o grupo A1.

Exemplo 10: Imunocoloração de tecido de ratinho injectado com células estaminais derivadas da decídua placentária

Após medição da pressão de perda urinária e da contractilidade do esfíncter uretral às 4 semanas e às 8 semanas, de acordo com os Exemplos 6 a 8 descritos acima, cada um dos tecidos uretrais foi colhido e congelado sem danos utilizando 2-metilbutano que tinha já sido arrefecido em azoto líquido. Os tecidos uretrais foram arrefecidos e seccionados, e depois foram submetidos a coloração H/E. Igualmente, de modo a observar a diferenciação das células estaminais em músculos lisos e músculos esqueléticos, os tecidos foram imunocorados com DAPI, actina muscular (-SMA) e cadeia pesada de miosina (MyHC) e foram observados com um microscópio de fluorescência.

Em resultado, como mostrado na FIG. 17, nos músculos uretrais do esfíncter normal dos ratinhos nus fêmea de acordo com o Exemplo 6, os músculos lisos eram abundantes, e os músculos esqueléticos estavam fracamente corados ("A", "B" e

"C" da FIG. 17). Após o seccionamento transversal do nervo pudendo, foi observada a redução na quantidade de músculos lisos ("D", "E" e "F" da FIG. 17). Quando as células estaminais derivadas da decídua placentária foram injectadas, às 4 semanas ("G", "H" e "I" da FIG. 17) e às 8 semanas ("J", "K" e "L" da FIG. 17), os músculos lisos ficaram corados de verde-claro, sugerindo que a quantidade dos músculos lisos estava aumentada. Igualmente, entre os músculos lisos, observaram-se células amarelas co-coradas com vermelho e verde. Na coloração MyHC, os músculos esqueléticos foram muito fracamente corados de verde, e as células injectadas entre as células lisas apresentaram-se vermelhas.

Igualmente, como mostrado na FIG. 18, não se observava o formato uretral original porque a uretra dos ratinhos machos foi cortada em espiral no Exemplo 8 como descrito acima; contudo, observou-se que foi expresso PKH no tecido após a experiência de contractilidade do esfíncter uretral ("A" e "B" da FIG. 18), sugerindo que as células estaminais derivadas da placenta injectadas contribuíram para a contracção do esfíncter uretral. Para referência, PKH é uma substância para coloração de fluorescência de células vivas, e neste Exemplo, as células estaminais derivadas da decídua placentária foram marcadas com PKH (vermelho) antes da injecção.

Em conclusão, nos Exemplos 6 a 8, em que se construíram modelos animais de incontinência urinária de esforço, similares a pacientes com incontinência urinária, a injecção das células estaminais derivadas da decídua placentária aumentou a pressão de perda urinária no modelo de ratinho nu de incontinência urinária e aumentou a contractilidade do esfíncter uretral no modelo de ratinho de incontinência urinária. A pressão de perda urinária não se alterou grandemente de acordo com o número de células estaminais injectadas, mas a contractilidade do esfíncter uretral aumentou à medida que aumentou o número de células estaminais injectadas. Isto sugere que as células estaminais derivadas da decídua placentária de acordo com a presente invenção podem também ser utilizadas como excelentes agentes terapêuticos celulares em pacientes de incontinência urinária.

Como mencionado acima, a decídua placentária e a decídua de fluido menstrual são principalmente compostas por células epiteliais uterinas. Nos Exemplos da presente invenção, foi especificamente demonstrado o feito terapêutico apenas das células estaminais derivadas da decídua placentária sobre a incontinência urinária, mas pode ser prontamente inferido que as células estaminais derivadas da decídua de fluido menstrual também têm o efeito de tratamento de incontinência urinária.

Exemplo 11: Imunocoloração de tecido de ratinho injectado com células estaminais derivadas de tecido adiposo (exemplo de referência; não faz parte do âmbito da presente invenção)

Após medição da pressão de perda urinária e da contractilidade do esfíncter uretral às 4 semanas e às 8 semanas, de acordo com os Exemplos 7 a 9 descritos acima, cada um dos tecidos uretrais foi colhido e congelado sem danos utilizando 2-metilbutano que tinha já sido arrefecido em azoto líquido. Os tecidos uretrais foram arrefecidos e seccionados, e depois submetidos a coloração H/E. Igualmente, de modo a observar a diferenciação das células estaminais em músculos lisos e músculos esqueléticos, os tecidos foram imunocorados com DAPI, actina muscular (-SMA) e cadeia pesada de miosina (MyHC) e foram observados com um microscópio de fluorescência.

Em resultado, como mostrado na FIG. 19, no esfíncter uretral normal dos ratinhos nus preparados no Exemplo 7, os músculos lisos eram abundantes, e os músculos esqueléticos estavam fracamente corados ("A", "B" e "C" da FIG. 19). Após o seccionamento transversal do nervo pudendo, foi observada a redução na quantidade de músculos lisos ("D", "E" e "F" da FIG. 19). Quando as células estaminais derivadas de tecido adiposo foram injectadas (às 8 semanas), os músculos lisos ficaram corados de verde, sugerindo que a quantidade dos músculos lisos estava aumentada. Igualmente, entre os músculos lisos, observaram-se células amarelas co-coradas com vermelho e verde. Na coloração MyHC, os músculos esqueléticos foram muito fracamente corados, e as células injectadas entre as células lisas apresentaram-se vermelhas.

Igualmente, como mostrado na FIG. 20, não se observava o formato uretral original porque a uretra dos ratinhos machos foi cortada em espiral no Exemplo 9 como descrito acima;

contudo, observou-se que foi expresso PKH no tecido após a experiência de contractilidade do esfíncter uretral (8 semanas; "A" e "B" da FIG. 20), sugerindo que as células estaminais derivadas de tecido adiposo injectadas contribuíram para a contracção do esfíncter uretral. Para referência, PKH é uma substância para coloração de fluorescência de células vivas, e neste Exemplo, as células estaminais derivadas de tecido adiposo foram marcadas com PKH (vermelho) antes da injecção.

APLICABILIDADE INDUSTRIAL

Como descrito acima em detalhe, as células estaminais derivadas da decídua da placenta ou do fluido menstrual de acordo com a presente invenção têm uma excelente capacidade para se diferenciarem em miócitos, e assim apresentam os efeitos de aumentar a pressão de perda urinária e a contractilidade do esfíncter uretral. Deste modo, as células estaminais são úteis como um agente para o tratamento de incontinência urinária.

Embora a presente invenção tenha sido descrita em detalhe com referência a características específicas, será evidente para os peritos na especialidade que esta descrição é apenas de uma concretização preferida e não limita o âmbito da presente invenção. Assim, o âmbito substantivo da presente invenção será definido pelas reivindicações anexas e seus equivalentes.

Lisboa, 2014-07-16

REIVINDICAÇÕES

1. Agente terapêutico celular contendo células estaminais derivadas da decídua da placenta ou de fluidos menstruais para utilização no tratamento de incontinência urinária, em que as células estaminais derivadas da decídua da placenta têm as seguintes características:

(a) apresentam imunofenótipos positivos para CD29 e CD90, mas negativos para CD31 e CD45;

(b) apresentam imunofenótipos positivos para Oct4, SSEA-4 e Cripto-1;

(c) crescem fixadas a plástico, apresentando características morfológicas de formato redondo ou em fuso, e formam esferas em meio SFM de modo que são susceptíveis se serem mantidas num estado indiferenciado durante um longo período de tempo; e

(d) têm a capacidade de se diferenciar em miócitos.

Lisboa, 2014-07-16

FIG. 1

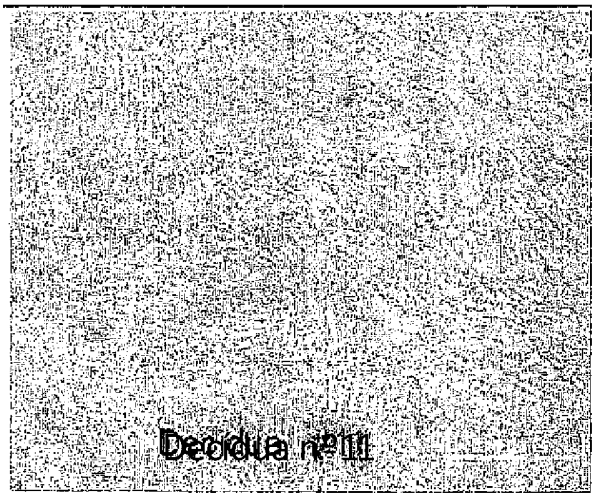

Decídua nº III

FIG. 2

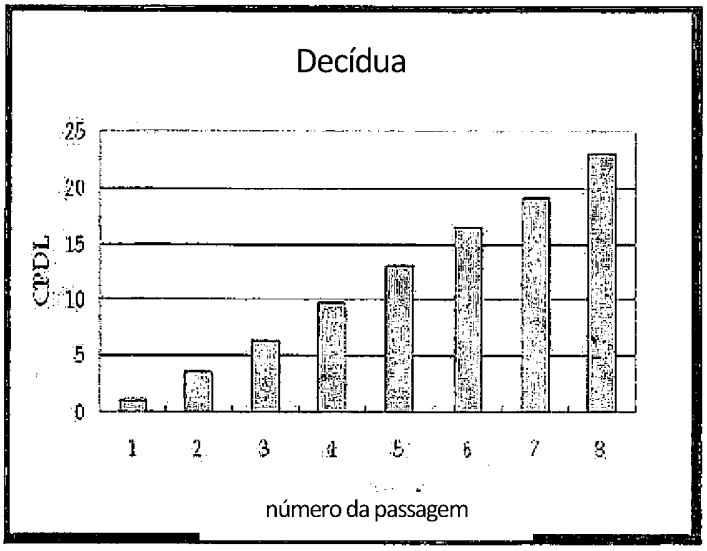

Decídua
25
20
15
10
5
0
CPDL
1
2
3
4
5
6
7
8
número da passagem

FIG. 3

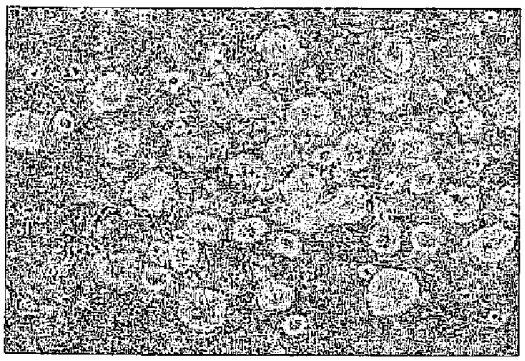


FIG. 4

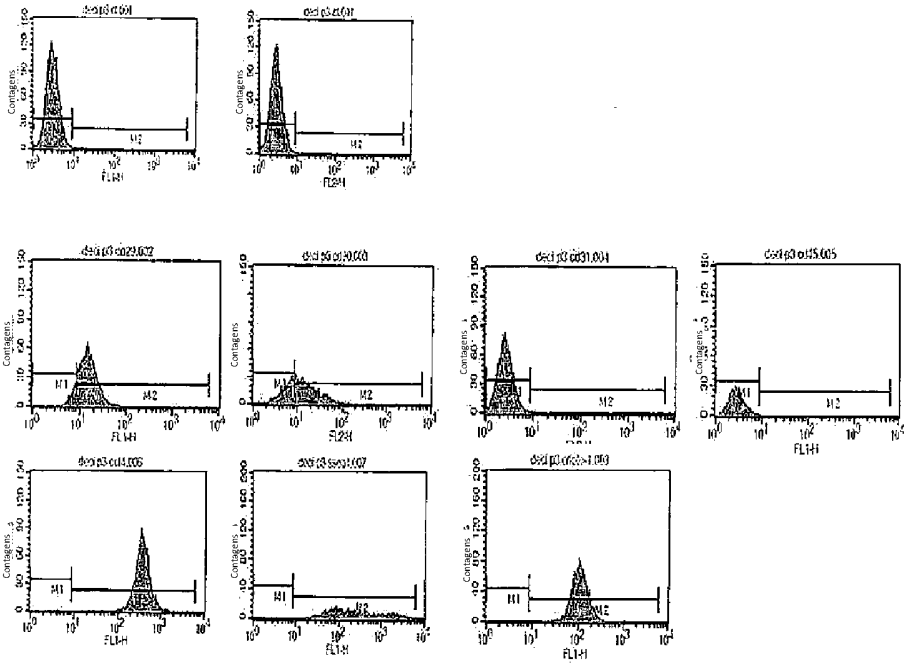


FIG. 5

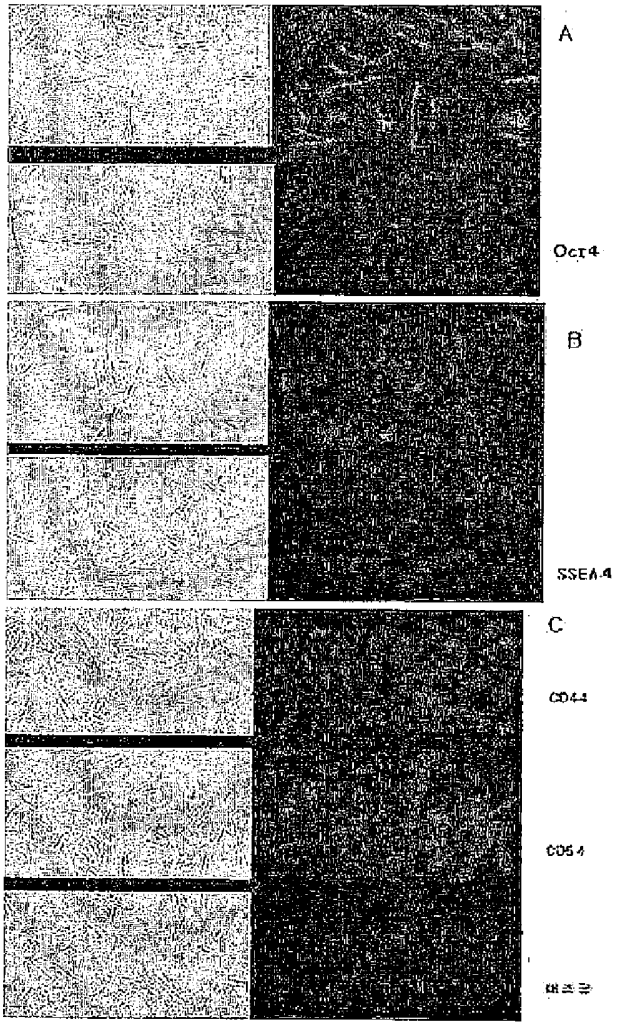


FIG. 6

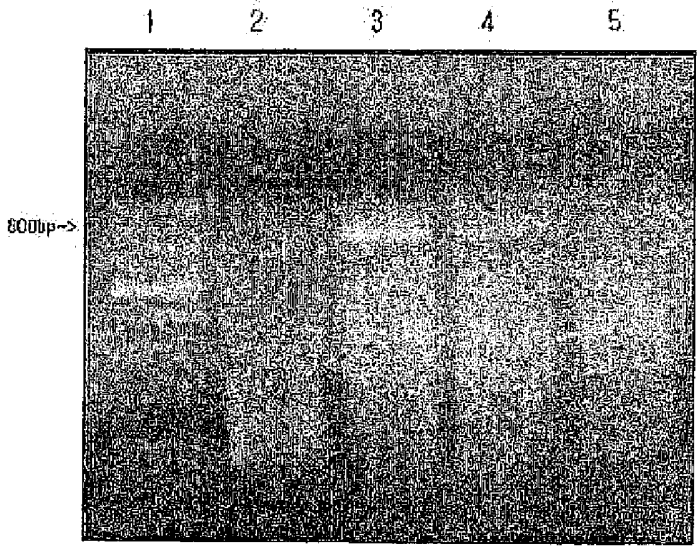


FIG. 7

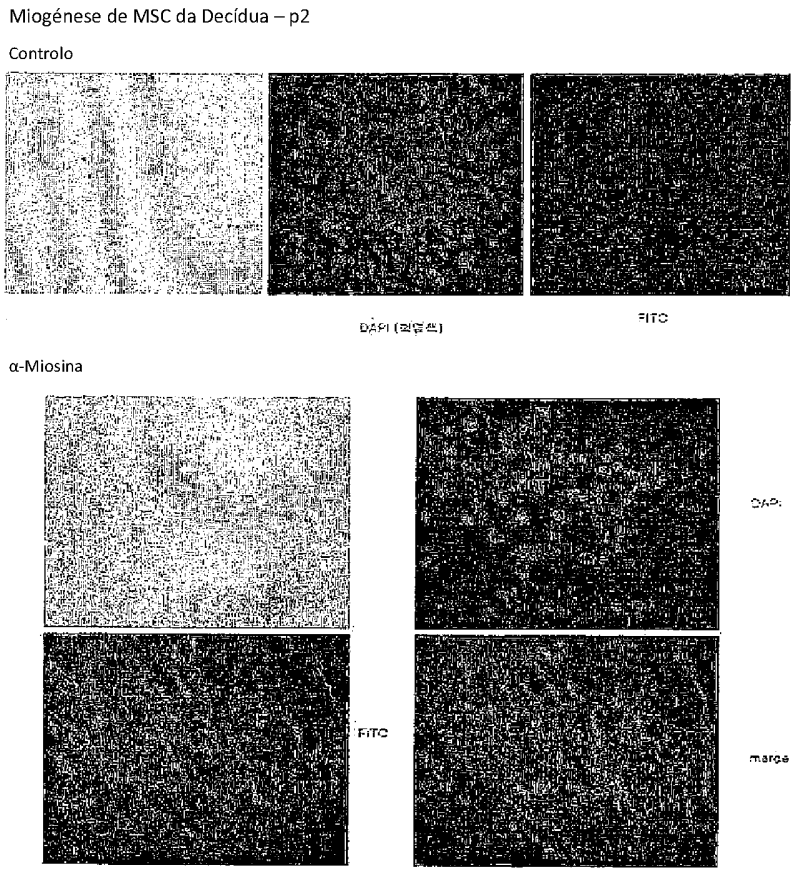

Miogénese de MSC da Decídua – p2
Controlo
DAPI (핵염색)
FITC
α-Miosina
DAPI
FITC
marge

FIG. 8

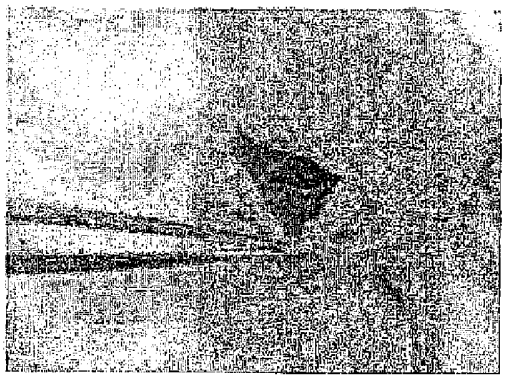


FIG. 9

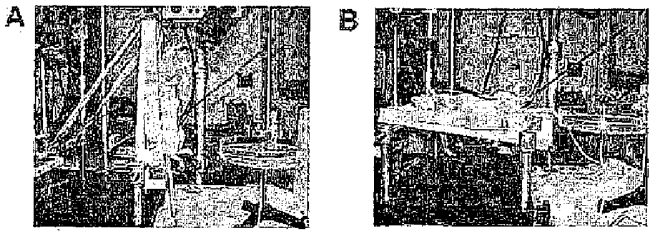


FIG. 10

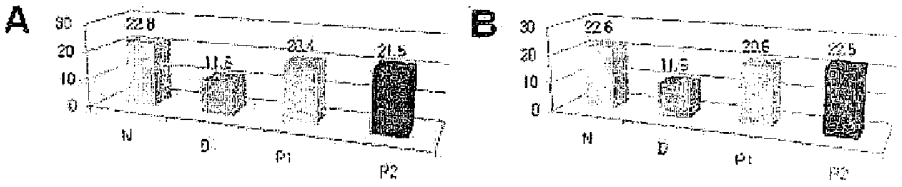


FIG. 11

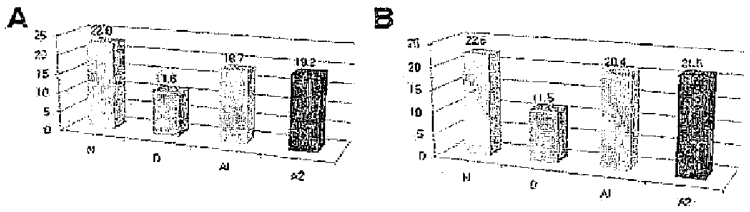


FIG. 12

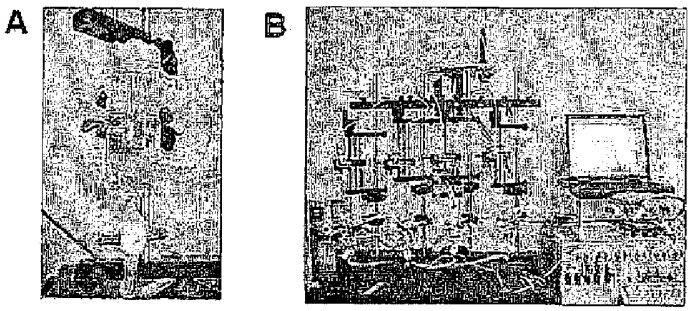


FIG. 13

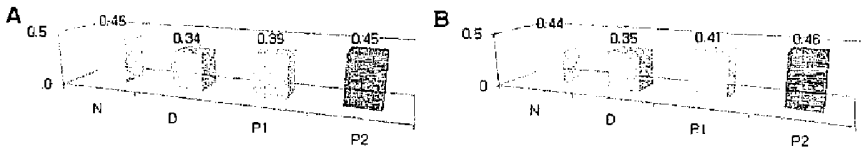


FIG. 14

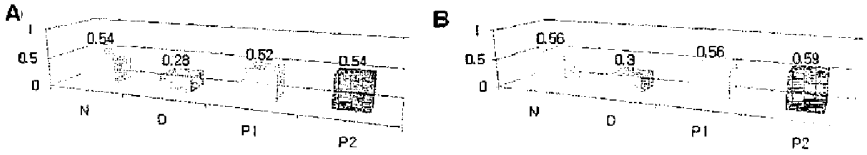


FIG. 15

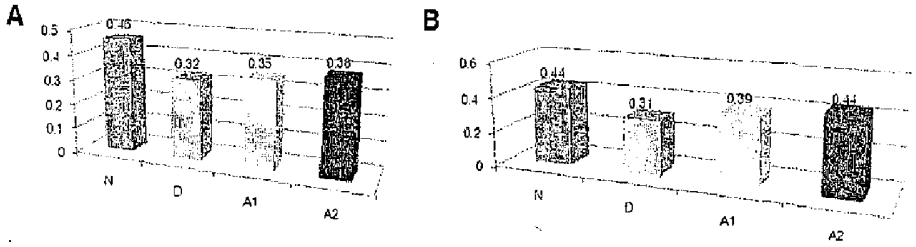


FIG. 16

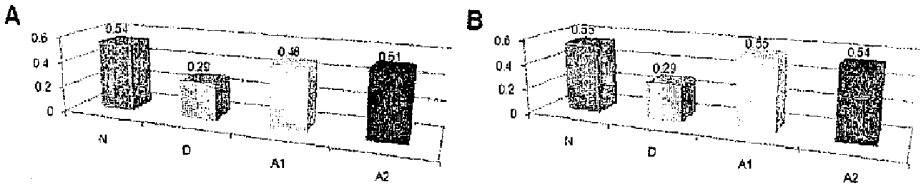


FIG. 17

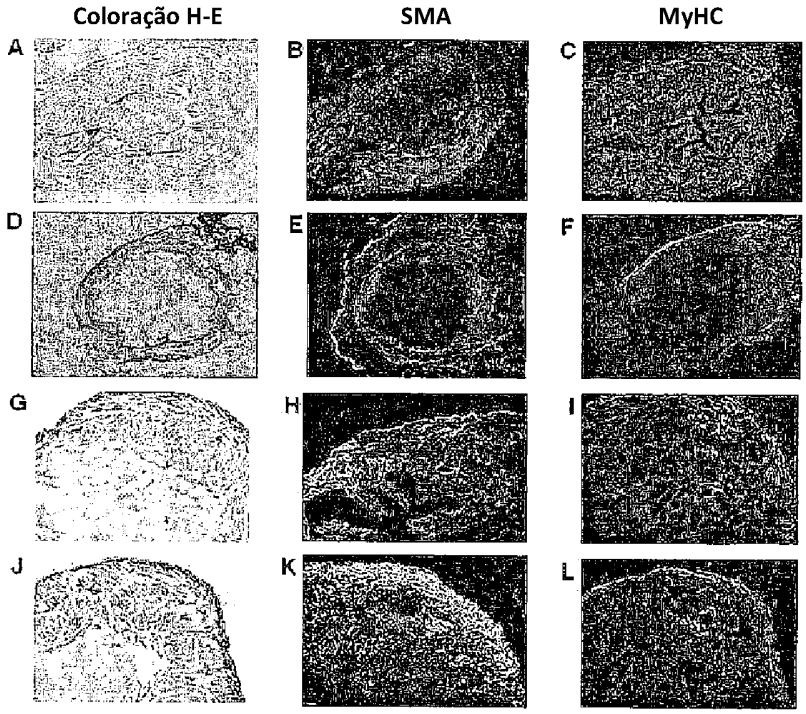


FIG. 18

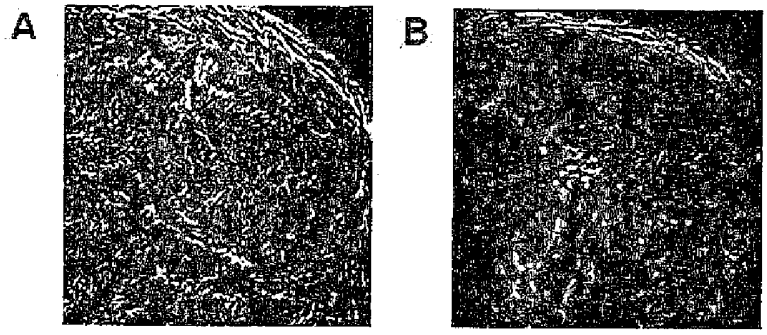


FIG. 19

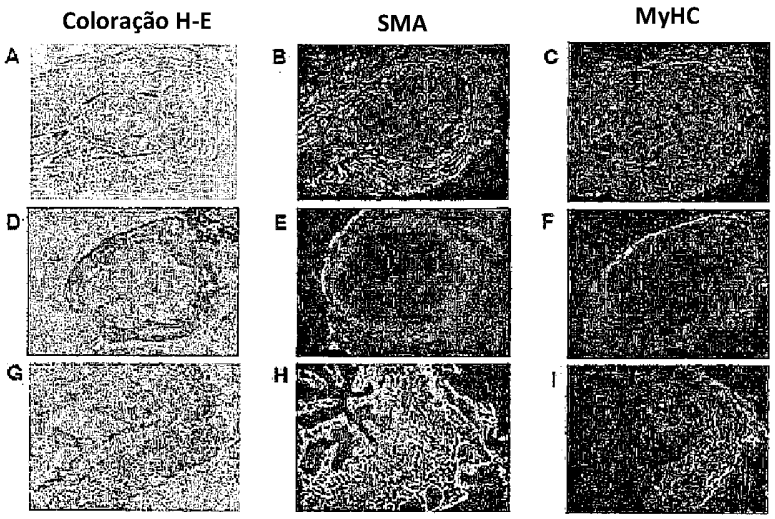


FIG. 20