

(11) Número de Publicação: **PT 2576768 T**

(51) Classificação Internacional:

C12N 5/00 (2017.01) **C12N 5/73** (2017.01)
A61K 35/51 (2017.01) **C12N 5/07** (2017.01)
A61L 27/38 (2017.01) **C12N 5/775** (2017.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2011.06.01	(73) Titular(es): AUXOCELL LABORATORIES, INC. 245 FIRST STREET SUITE 1800 CAMBRIDGE, MA 02142 US
(30) Prioridade(s): 2010.06.01 US 350303 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2013.04.10	
(45) Data e BPI da concessão: 2017.05.10 156/2017	(72) Inventor(es): ROUZBEH R. TAGHIZADEH, US
	(74) Mandatário: MANUEL BASTOS MONIZ PEREIRA RUA DOS BACALHOEIROS, 4 1100-070 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **CÉLULAS ESTAMINAIS DA GELEIA NATIVA DE WHARTON E A SUA PURIFICAÇÃO**

(57) Resumo:

AS CÉLULAS ESTAMINAIS DA GELEIA DE WHARTON NÃO CULTIVADAS E OS MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO, ARMAZENAMENTO E USO SÃO FORNECIDOS.

RESUMO

CÉLULAS ESTAMINAIS DA GELEIA NATIVA DE WHARTON E A SUA PURIFICAÇÃO

As células estaminais da geleia de Wharton não cultivadas e os métodos de purificação, armazenamento e uso são fornecidos.

DESCRIBÇÃO
CÉLULAS ESTAMINAIS DA GELEIA NATIVA DE WHARTON E A SUA
PURIFICAÇÃO

REFERÊNCIA CRUZADA PARA APLICAÇÕES RELACIONADAS

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O tecido do cordão umbilical é uma fonte rica de células estaminais. O sangue do cordão umbilical inclui células estaminais, incluindo células estaminais hematopoiéticas que podem ser usadas para repovoar o sangue e o sistema imunológico de uma pessoa. A geleia de Wharton, uma substância gelatinosa dentro do cordão umbilical, contém uma população adicional de células estaminais, distintas das encontradas no sangue do cordão umbilical. Tal como aqui utilizado, "geleia de Wharton" pode incluir ainda a camada epitelial amniótica do cordão umbilical. O processamento e a cultura da geleia de Wharton permitem o isolamento de células estaminais mesenquimais que podem ser usadas para regenerar uma variedade de tecidos (ver, por exemplo, Patente US No. 5,919,702).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Os presentes inventores descobriram que o processo de cultivo de células a partir de geleia de Wharton altera substancialmente as características das células. Em comparação com uma população de células cultivadas *in vitro*, as células de geleia de Wharton não cultivadas são molecularmente diferente, como pode ser visto, por exemplo, num perfil molecular diferente nas suas superfícies celulares. Mais importante, os inventores descobriram que as células de geleia de Wharton minimamente manipuladas são

substancialmente mais potente *in vivo* do que as células de geleia de Wharton cultivadas.

Os inventores desenvolveram um método para purificar células estaminais da geleia de Wharton sem a necessidade de um passo de cultivo. De acordo com a presente invenção, o método inclui a separação de células estaminais da geleia de Wharton nativa, não cultivadas, de um tecido digerido que inclui a geleia de Wharton, um passo prévio de digerir o tecido, cortando mecanicamente o tecido e antes de digerir o tecido que inclui a geleia de Wharton, o tecido é dissecado para remover artérias e veias.

Digestão incompleta pode deixar fragmentos de tecido não digerido. O método inclui a separação do tecido digerido e não digerido, como por sedimentação do tecido não digerido. O processo de sedimentação é acelerado, por exemplo, por centrifugação. O tecido digerido é filtrado para remover o tecido não digerido; As células estaminais de geleia de Wharton não cultivadas podem ser separadas do filtrado, como por sedimentação ou filtração. O tecido digerido, que pode ser viscoso, é lavado ou diluído antes de um passo de separação, embora outros passos tais como a centrifugação vigorosa possam ser eficaz mesmo na ausência de um passo de lavagem ou diluição.

Os inventores também desenvolveram métodos de recuperação de ambas as células estaminais cultivadas e não cultivadas de geleia de Wharton. O método inclui a purificação de células estaminais de geleia de Wharton não cultivadas de acordo com qualquer dos métodos descritos acima e a cultura de células estaminais mesenquimais a partir do tecido não digerido. Desta forma, as células estaminais não cultivadas de potência superior são obtidas a partir do tecido digerido e as células adicionais são cultivadas a partir dos restos de tecido não

digerido. As células estaminais mesenquimais são cultivadas opcionalmente em um meio que inclui a geleia de Wharton.

A invenção também se relaciona com a purificada, células estaminais não cultivadas da geleia de Wharton e à sua utilização. Tal como aqui utilizado, "purificado" indica que as células estaminais da geleia de Wharton foram isoladas e separadas de certos componentes acelulares da geleia de Wharton, mas não indicam que as células estaminais foram necessariamente purificadas de outros tipos de células que também podem estar presentes em geleia de Wharton. Em algumas formas de realização, o caule de geleia de Wharton purificado e não cultivado as células são substancialmente isentas de geleia semissólida de Wharton. Pode permanecer um certo grau de geleia de Wharton liquefeita (digerido em um líquido viscoso, por exemplo), ou as células podem estar totalmente isentas de geleia de Wharton e opcionalmente em outro meio, como uma solução estéril, uma solução de sal equilibrada, uma solução crioprotectora, de plasma, etc. Em outras formas de realização, as células estaminais da geleia de Wharton purificadas são mantidas a uma temperatura abaixo de 0 °C, abaixo de -20 °C, abaixo de -80 °C ou abaixo de -180 °C, por exemplo num frasco, saco ou outro recipiente adequado a tal temperatura. As células estaminais de geleia de Wharton purificadas não cultivadas da invenção podem diferir substancialmente das células estaminais mesenquimais cultivadas da geleia de Wharton, incluindo diferenças no nível de expressão da superfície celular de um (ou dois ou três ou quatro ou mais) de CD49B, CD105, CD133, HLA-ABC, CD73, CD44, SSEA-4, CD29 e/ou CD90. Em algumas formas de realização, por exemplo, a população de células estaminais de geleia de Wharton não cultivadas reduziu os níveis de expressão de superfície de células CD73 e CD105 em comparação com as células estaminais mesenquimais cultivadas a partir

de geleia de Wharton. Tanto CD73 como CD105 foram relatados como marcadores para células estaminais mesenquimais. Conseqüentemente, o nível reduzido de CD73 e CD105 nas superfícies celulares de células estaminais de geleia de Wharton não cultivadas é consistente com a identificação dessas células como substancialmente diferentes das células estaminais mesenquimais cultivadas.

Células estaminais não cultivadas da geleia de Wharton são multipotentes e podem ser administradas a um indivíduo como parte de um método terapêutico, por exemplo, para curar um tecido ou para auxiliar na regeneração do tecido. Em certas formas de realização, as células estaminais da geleia de Wharton são vantajosamente autólogas ou alóginas para o sujeito.

Também aqui divulgado um solução homogênea incluindo geleia de Wharton. A solução pode ser obtida, por exemplo, digerindo a geleia de Wharton para tornar um líquido viscoso e partículas de purificação, como tecido ou células não digeridas, do resumo para obter uma solução homogênea. A solução pode opcionalmente ser diluída, tal como por uma solução de sal equilibrada ou outra solução estéril, para reduzir a viscosidade. A solução pode ser esgotada das células, quer removendo substancialmente todas as células ou reduzindo o número de células na solução. A solução pode ser congelada (por exemplo, a uma temperatura de -20°C ou abaixo) e pode ser opcionalmente utilizada em um processo de cultura de células. Assim, a invenção também proporciona métodos para manter uma célula misturando a célula em uma solução homogênea incluindo a geleia de Wharton, por exemplo, adicionando a célula à solução; por adição da solução a uma suspensão compreendendo a célula; Ou aplicando a solução a uma superfície à qual a célula aderiu. A célula pode ser

cultivada *in vitro*. Numa concretização, a célula é uma célula estaminal multipotente, como uma célula estaminal mesenquimal da geleia de Wharton.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Outras características e vantagens da presente invenção, bem como a invenção em si, podem ser mais completamente compreendidos a partir da seguinte descrição das várias formas de realização, quando lido em conjunto com os desenhos anexos, nos quais:

FIG. 1 representa graficamente a eficácia *in vivo* de células não cultivadas de geleia de Wharton estaminais (WJ MSCs) ou células estaminais mesenquimatosas expandidas em cultura (Expanded WJ MSCs) em um ensaio de co-transplante com células estaminais hematopoiéticas humanas a partir de sangue do cordão umbilical, com resultados mostrados como uma % de células da medula óssea que expressam CD45 humano na sua superfície, que serve como um marcador de substituição para o enxerto de células humanas transplantadas para camundongos;

FIG. 2 representa graficamente, para cada um dos treze marcadores de superfície celular (CD49B, CD105, CD34, CD45, CD133, HLA-ABC, CD73, HLA-DR, CD14, CD44, SSEA-4, CD29 e CD90), em duas dimensões o número de células estaminais da geleia Wharton não cultivadas medidas para ter um nível de expressão particular do marcador na superfície celular; e

FIG. 3 é uma descrição gráfica comparável do número de células estaminais mesenquimais expandidas em cultura de geleia de Wharton com um nível de expressão particular do marcador na superfície celular.

DESCRIÇÃO DETALHADA

O presente pedido proporciona métodos para a purificação de células estaminais geleia de Wharton, sem a necessidade de um passo de cultura. As células resultantes são particularmente úteis terapeuticamente, tendo potência superior quando comparadas às células estaminais expandidas em cultura da geleia de Wharton. O aplicativo também fornece uma solução homogênea da geleia de Wharton que pode ser usada, por exemplo, em um processo de manutenção de células, como na cultura.

Para proporcionar uma compreensão geral da invenção, serão agora descritas algumas formas de realização ilustrativas.

Purificação de células estaminais de geleia de Wharton não cultivadas

A purificação de células estaminais da geleia de Wharton requer a separação das células não cultivadas a partir de um tecido digerido que inclui geleia de Wharton. O tecido do cordão umbilical pode ser dissecado para remover as artérias e veias e depois processado para maximizar a superfície disponível. Este processamento geralmente pode envolver qualquer forma de aumentar mecanicamente a área superficial do tecido, mas geralmente envolve corte fino ou picada microscopicamente no tecido em pequenos fics ou peças microscópicas, como tesoura de dissecação ou bisturi.

Antes das células serem separadas a partir do tecido digerido, quaisquer fragmentos remanescentes de tecido não digerido são opcionalmente descartados para facilitar a subsequente purificação das células. Dependendo do seu tamanho, o tecido não digerido pode ser removido por extração física (por exemplo, com fórceps), decantação, aspiração,

sedimentação (opcionalmente acelerada por centrifugação) ou filtração, por exemplo.

A separação das células a partir do tecido digerido é conseguida por sedimentação das células a partir de uma mistura homogênea que contém o tecido digerido. Embora a sedimentação por gravidade possa ser utilizada, o processo de sedimentação pode ser acelerado, por exemplo, por uma centrífuga para aumentar o movimento descendente das células através (e, em certo sentido, for das). Um desses processos é descrito no Exemplo 1. Após a separação, as células estaminais da geleia de Wharton estão substancialmente livres da geleia de Wharton. Uma vez que o tecido digerido é geralmente viscoso, o tecido pode ser lavado ou diluído com uma solução estéril apropriada (tal como uma solução salina tamponada) em qualquer fase do processo. De fato, após as células terem sido separadas da mistura, podem ser realizadas lavagens adicionais para limpar ainda mais as células conforme desejado.

Células estaminais de geleia de Wharton

As células estaminais de geleia de Wharton purificadas podem ser usadas imediatamente num paciente, se houver uma necessidade imediata. Tipicamente, no entanto, as células são criopreservadas em nitrogênio líquido até serem necessárias, tipicamente com um crioprotetor, como DMSO ou dextrano, e muitas vezes em uma solução tal como plasma autólogo ou 5% de albumina de soro humano. Como células estaminais multipotentes, as células estaminais de geleia de Wharton não cultivadas podem ser usadas para tratar ou regenerar qualquer uma variedade de tecidos como osso, cartilagem, gordura ou músculo. Essas células podem facilitar o enxerto hematopoiético e têm o potencial de regular e reprimir as respostas imunes no hospedeiro.

Tal como descrito no Exemplo 4, uma população de células não cultivadas purificadas a partir de geleia de Wharton é demonstravelmente diferente, ao nível molecular, a partir de uma população de células a partir de geleia de Wharton que foram expandidas em cultura ex vivo. Por exemplo, embora ambas as populações incluam células que expressam CD49B, CD105, HLA-ABC, CD73, CD44, SSEA-4, CD29 e CD90, as populações diferem em seus perfis de expressão para a maioria, se não todos esses marcadores. Assim, estes ou outros marcadores podem ser usados, individualmente ou em combinação (como dois, três, quatro, cinco, seis, sete ou todos os oito desses marcadores), para identificar e caracterizar uma população de células estaminais, como, por exemplo, Aqueles derivados do tecido do cordão umbilical e/ou para caracterizar a potência biológica das células.

Produtos adicionais

O processo de purificação também proporciona tipicamente produtos úteis adicionais. Por exemplo, quando as células são separadas do tecido digerido, o restante tecido digerido esgotado é uma solução rica e estéril que pode ser usada para manter células (em cultura, por exemplo). É apreciado que algumas células podem estar presentes, embora em números substancialmente reduzidos, dentro desta solução rica e estéril, esgotada em células derivada do tecido digerido. Alternativamente, a solução pode ser completamente desprovida de células. Esta solução homogênea pode ser congelada (por exemplo, a -20 °C ou abaixo) para uso posterior.

Quaisquer fragmentos de tecido não digerido remanescente, após um processo de digestão são também particularmente úteis, uma vez que estes podem ser usados como uma fonte de células estaminais mesenquimatosas cultivadas utilizando

métodos padrão para a expansão de células estaminais mesenquimais em cultura a partir de geleia de Wharton. De fato, a solução de geleia de Wharton homogênea que é, em algum sentido, um subproduto do processo de purificação pode ser usada na cultura de células estaminais mesenquimais a partir dos fragmentos de tecido não digerido. Desta forma, o processo de purificação cujo objetivo primário é a preparação de células estaminais geleia de Wharton não cultivadas também pode fornecer, como benefício adicional, células estaminais mesenquimais que são expandidas em cultura dos fragmentos de tecido não digeridos com a ajuda da solução de geleia de Wharton.

Assim, a presente invenção proporciona duas fontes para a sementeira e derivação de cultura expandido células estaminais mesenquimais derivadas geleia de Wharton. A primeira fonte é o tecido do cordão umbilical não digerido. Como a digestão enzimática raramente digere completamente o tecido, o tecido não digerido restante pode ser utilizado como fonte de semeadura para a expansão de células estaminais mesenquimais. Uma segunda fonte para a derivação de células estaminais mesenquimais são as células estaminais da geleia de Wharton derivadas do tecido digerido. A digestão enzimática corta as ligações cruzadas de colagênio dentro da geleia de Wharton e libera as células incorporadas. Conforme descrito anteriormente, as células liberadas sob a forma de suspensões de célula única podem ser processadas e criopreservadas para uso terapêutico posterior. Alternativamente, essas células podem ser usadas como uma fonte de semeadura para a expansão de células estaminais mesenquimais. Além disso, a geleia de Wharton, em pós-digestão, que pode ser utilizada como suplemento para a derivação de células estaminais mesenquimais de ambos os tecidos digeridos e não digeridos. Seu uso como suplemento

não é necessário para a derivação da cultura, mas pode reduzir o tempo necessário para derivação e expansão.

Em adição à cultura de aderência bidimensional rotineiramente utilizada para a expansão de células estaminais mesenquimais, biorreatores pode ser utilizado para expandir as células estaminais mesenquimais em tridimensionais culturas em suspensão. Os biorreatores permitem a produção em escala-se e imitam de perto as características de perfusão *in vivo* do cordão umbilical. As células estaminais mesenquimais podem ser derivadas inicialmente de culturas bidimensionais ou tridimensionais e subsequentemente propagadas em culturas tridimensionais para produção ampliada. Os biorreatores podem ser suplementados com esferas microportadoras para permitir a aderência e propagação das células estaminais mesenquimais dentro dos biorreatores.

EXEMPLOS

A invenção é ainda ilustrada pelos exemplos seguintes, que são fornecidos apenas para fins ilustrativos, e não devem ser interpretados como limitando o âmbito ou conteúdo da invenção de qualquer maneira.

Exemplo 1. Purificação de células estaminais da geleia nativa de Wharton e solução homogênea de geleia de Wharton.

Cordões umbilicais foram recolhidos em recipientes estéreis espécimes dentro de 48 horas após o momento da entrega. Em um gabinete de biossegurança, foram adicionados ao cordão umbilical em uma câmara de coleta de cordão umbilical 10 mL de tampão B (gentamicina 50 µg/mL, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina em solução salina

tamponada com fosfato Dulbecco estéril). Outros antibióticos, como 0,25 µg/ml de anfotericina B, 100 µg/ml de estreptomicina e/ou 10 µg/mL de ciprofloxacina, também podem ser adicionados ao tampão B ou substituídos por qualquer antibiótico no tampão B. O conteúdo da câmara de coleta foram então misturados por turbilhão e mantidos a temperatura ambiente por menos de 72 horas. O conteúdo foi rodado novamente por aproximadamente 10-15 segundos para limpar o tecido do cordão umbilical. O sangue coagulado, se evidente na superfície do cordão umbilical, foi cuidadosamente removido usando ferramentas de dissecação.

O cordão umbilical foi transferido para uma placa de Petri utilizando fórceps estéreis e cortado em segmentos de 3-5 cm, usando uma tesoura cordão umbilical estéril ou bisturi. Cada segmento foi então individualmente dissecado da seguinte forma. Resumidamente, um segmento a ser dissecado foi colocado em uma placa de Petri de 150 mm. As duas artérias e uma veia do cordão umbilical foram localizadas ao visualizar a seção transversal do segmento de tecido. Usando tesouras de dissecação, uma incisão foi feita entre as duas artérias. Com dois pincéis de tecido ou Dumont, o cordão foi puxado ao longo do comprimento do tecido, rasgando cuidadosamente o tecido das artérias e da veia. Uma vez que o tecido foi aberto, a veia foi localizada e excisada usando uma pinça estéril de ponto fino em cada mão. As duas artérias foram posteriormente localizadas e excisadas, e o tecido dissecado foi colocado na tampa estéril, interna, da placa de dissecação de 150 mm.

O tecido foi, depois, triturado em pedaços pequenos/filamentos com tesouras de dissecação para, pelo menos, 5 minutos, ou até que um tecido picado consistente foi obtido. A dissecação inicial e a picada foram realizadas

em diferentes porções da placa de dissecação para minimizar a contaminação com excesso de sangue e/ou vasos dissecados. O último tecido moído parecia tecido no solo e não tinha nem poucos pedaços de tecido óbvio. Geralmente, as peças de tecido trituradas tinham uma seção transversal de cerca de 1 mm². O tecido moído foi colocado num tubo cônico esterilizado e rotulado.

Uma vez que todos os segmentos de tecido do cordão umbilical foram dissecados, picada e adicionado ao tubo cônico, de 10 ml de uma solução de CE (2,5 mg/mL de colagenase NB6 (Serva) e 2 mM de cloreto de cálcio em salina tamponada com fosfato de Dulbecco) foram igualmente Adicionado. O conteúdo do tubo foi misturado por inversão/agitação várias vezes até se obter uma mistura uniforme. O parafilme foi colocado em torno da tampa do tubo para evitar vazamentos e contaminação cruzada. O exterior do tubo foi pulverizado com etanol a 70% e colocado num agitador orbital/misturador a aproximadamente 175 RPM dentro de uma incubadora a 37 °C durante aproximadamente duas horas. A cada hora, o tubo foi agitado vigorosamente para ajudar a dissociar o tecido. Após aproximadamente duas horas, o tubo foi novamente pulverizado com 70% de etanol e retornou ao gabinete de segurança de biossegurança.

O tecido digerido foi depois filtrado usando uma unidade de filtro Steriflip® (Millipore) para remover qualquer tecido não digerido a partir do tecido digerido. Como a geleia de Wharton digerida tem uma consistência viscosa, semelhante a um mel, foi tomado cuidado para evitar a contaminação ao abrir tampas e manipular a geleia. O tubo foi colocado na posição vertical, e a sua tampa foi removida cuidadosamente. Para remover a geleia conectando o tubo e a tampa de forma tão completa e esterilizada quanto possível, o tubo e a tampa

foram afastados até que se seguissem pequenos fios de geleia. Os movimentos circulares removeram então os fios finais da geleia da tampa. Foi tomado cuidado para não contaminar o pescoço do tubo com a geleia. Uma vez que a tampa foi removida, adicionaram-se 20 mL de solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco para diluir a geleia. A tampa foi substituída e apertada, e o tubo foi invertido ou agitado várias vezes para misturar. A tampa foi novamente removida cuidadosamente e a unidade de filtro Steriflip® foi aparafusado na parte superior do tubo e firmemente fixada. A montagem foi então virada para que o tubo cônico de 50 mL fosse de cabeça para baixo.

Uma fonte de vácuo regulado foi ligada ao orifício de vácuo no lado da unidade de filtro. A unidade de filtro foi mantida em posição vertical enquanto filtrava. Se necessário, o conjunto tubo/filtro foi rodado verticalmente para desalojar o tecido preso no filtro. Uma vez que todo o líquido foi filtrado, o vácuo foi desligado e o tubo cônico de 50 mL foi removido. Foram adicionados 10 mL de solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco ao tubo cônico de 50 mL para lavar as células restantes que podem ter aderido aos lados ou ao fundo do tubo. A tampa do tubo foi substituída e apertada e o tubo foi invertido ou agitado várias vezes para lavar o fundo e os lados do tubo. A tampa foi novamente removida e o tubo novamente ligado à unidade de filtro. O vácuo foi reaplicado até que todo o líquido tivesse passado pelo filtro, altura em que o conjunto foi desconectado do vácuo.

O volume total do filtrado foi de aproximadamente 50 mL. Se necessário, a solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco foi adicionada ao filtrado para levar o volume final a 50 mL. A tampa foi colocada no tubo de filtrado e firmemente segura. O exterior do tubo foi pulverizado com álcool a 70%

e selado com película para evitar fugas e contaminação cruzada. O tubo foi invertido/agitado várias vezes até que a geleia e a solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco fossem homogeneizadas. O tubo foi então colocado num agitador (a 175 RPM) numa incubadora a 37 °C durante cinco minutos para homogeneizar ainda mais a geleia, com inversão/agitação adicional conforme necessário até se obter uma mistura uniforme. O tubo foi novamente pulverizado com 70% de etanol e voltou para o gabinete de biossegurança.

A geleia de Wharton digerida homogeneizada foi então dividida em um certo número de tubos de 50 mL cônico, dependendo do peso inicial do cordão umbilical. Se o peso inicial não excedesse 15 gramas, utilizou-se um único tubo cônico. Se o peso inicial não excedesse 30 gramas, foram utilizados dois tubos. O número de tubos utilizados foi igual ao peso inicial do cordão umbilical em gramas, dividido por 15, arredondado. Cada tubo recebeu um volume aproximadamente igual da geleia; O cuidado foi tomado para não contaminar o pescoço dos tubos.

O volume de cada tubo foi depois levado a 50 mL com solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco, e os conteúdos de cada tubo foram novamente homogeneizada. Posteriormente, cada tubo estava bem fechado; Pulverizado com etanol a 70%; Selado com filme; Invertido/abalado várias vezes; E colocado em um agitador (a 175 RPM) em uma incubadora a 37 °C durante cinco minutos para homogeneizar ainda mais a geleia, com inversão/agitação adicional, conforme necessário, até se obter uma mistura uniforme.

Uma vez homogeneizada, os tubos foram centrifugados durante 20 minutos a 750 x g a 37 °C. Depois de girar, um sedimento celular estava normalmente presente no fundo de cada tubo de 50 mL. Na ausência de um grânulo, os tubos foram submetidos a 1000 x g durante 15 minutos a 37 °C. Os tubos foram

pulverizados com 70% de etanol e retornaram ao gabinete de segurança de biossegurança. O sobrenadante foi decantado lentamente, a uma taxa constante, sem agitar ou balançar o tubo para evitar o deslocamento do grânulo. O sobrenadante decantado, uma solução homogênea de geleia de Wharton, esgotada de células, foi armazenada em ou abaixo de - 20 °C como um reagente separado útil para cultivar células estaminais.

Para cada pelete de células, foram adicionados 10 mL de solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco. Os tubos foram cobertos de forma segura e foram submetidos a vórtice, invertidos e/ou pipetados várias vezes para misturar bem até as células serem completamente suspensas. O conteúdo de todos os tubos de amostra foi então combinado usando uma pipeta em um tubo. Os tubos de amostra foram lavados com solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco para desalojar as células restantes, que também foram adicionadas ao tubo combinado, e o volume foi levado para 50 mL usando solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco. O tubo foi tapado e vortexado/invertido várias vezes para misturar. O tubo foi centrifugado durante 15 minutos a 500 x g a 37 °C. Um sedimento de células estava normalmente presente na parte inferior do tubo. Na ausência de uma pelota, o tubo foi absorvente a 750 x g durante 10 minutos a 37 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente decantado num balão de resíduos de modo a não perturbar o sedimento celular.

Subsequentemente, 25 mL de solução salina tamponada com fosfato da Dulbecco foram adicionados ao sedimento de células, depois de o tubo foi tapado e agitadas/invertidos várias vezes para voltar a suspender as células, as células foram passadas através de um filtro de tubo superior 70 micron. O filtro foi colocado em cima de um tubo cônico

estéril de 50 mL. As células ressuspensas foram libertadas gota a gota a partir de uma pipeta estéril de 25 mL, diretamente acima do centro do filtro, mas não tocando o filtro. A suspensão celular filtrada recolhida no tubo cônico de 50 mL. Adicionaram-se mais 20 mL de solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco para lavar o tubo anterior para maximizar a recuperação celular; Após a lavagem do tubo, estes 20 mL também passaram gota a gota através do filtro. A solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco adicional foi passada gota a gota através do filtro para levar o volume final a 50 mL.

O filtrado foi centrifugado durante 10 minutos a 500 x g a 37 °C. Um sedimento de células estava normalmente presente na parte inferior do tubo após o giro. Na ausência de uma pelota, o tubo foi absorvente a 750 x g durante 10 minutos a 37 °C. O exterior do tubo foi pulverizado com álcool a 70% antes de retornar ao gabinete de biossegurança, onde o sobrenadante foi decantado cuidadosamente para um balão de resíduos, de modo a não perturbar o sedimento celular. O volume no tubo foi levado até 4,3 mL usando solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco e os teores do tubo foram misturados por pipetagem, agitação e/ou vortex. Com uma pipeta de 1000 µL, a suspensão celular foi misturada e uma alíquota de 0,3 mL foi removida para análise de controle de qualidade, deixando 4,0 mL de uma suspensão celular purificada de células estaminais de geleia de Wharton não cultivadas.

Exemplo 2. Armazenamento de células estaminais da geleia de Wharton não cultivadas.

A suspensão de células purificada do Exemplo 1 foi criopreservada em um saco de congelação de 25 mL. Utilizando uma seringa de 60 mL com uma agulha 18G, 16 mL de plasma

autólogo, 5% de albumina de soro humano ou uma combinação destes foram adicionados à suspensão de células estaminais de geleia de Wharton purificada de 4 mL. Uma almofada de álcool foi utilizada para limpar a parte superior de um frasco de 55% de DMSO/5% Dextrano. Em seguida, removeu-se 5 mL da mistura DMSO/Dextrano utilizando uma seringa de 60 mL com uma agulha 18G e adicionou-se lentamente à suspensão celular. O tubo de suspensão celular foi encapsulado firmemente e gentilmente invertido para misturar, tomando cuidado para não fazer espuma ou bolhas. Usando a mesma seringa de 60 mL, 25 mL da suspensão celular foram transferidos para o saco de congelação. O saco de congelação foi armazenado numa lata de metal em um suporte de isopor a -80 °C durante 16 a 24 horas, opcionalmente seguido por um período intermediário em um congelador de nitrogênio líquido em que as células foram expostas apenas à fase de vapor do nitrogênio líquido E, em última análise, na fase líquida de nitrogênio líquido para armazenamento permanente. Alternativamente, o saco de congelamento com células pode ser armazenado permanentemente na fase de vapor do nitrogênio líquido.

Exemplo 3. A eficácia *in vivo*

A eficácia terapêutica de células estaminais de geleia não cultivadas de Wharton foi demonstrada num ensaio de co transplante com células estaminais hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical para renovar um sistema hematopoiético de mamíferos.

As células estaminais hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical podem ser administradas a um mamífero para reconstituir um sistema hematopoiético danificado, por exemplo, por radiação. O co transplante de células estaminais da geleia de Wharton melhora o processo de reconstituição,

aumentando o enxerto das células estaminais hematopoiéticas administradas e, portanto, sua capacidade de proliferar e recriar um sistema hematopoiético em seu novo hospedeiro.

Para testar a eficácia de células estaminais de geleia não cultivadas de Wharton, que foram coadministrados com células estaminais hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical para (NOD/SCID IL2R γ -nulo) ratos que tinham sido subletalmente irradiados no dia anterior com 300 cGy de gama - Radiação que abluu a medula óssea. 1.000.000 células de sangue de cordão umbilical mononucleares foram administradas aos camundongos através da veia da cauda, isoladamente ou com 10.000, 50.000 ou 100.000 células estaminais de geleia de Wharton não cultivadas, ou com 1.000.000 células estaminais mesenquimais cultivadas a partir de geleia de Wharton. Sessenta dias depois, a medula óssea foi obtida dos camundongos para medir o número de células que expressam CD45 humano, um marcador de superfície celular para células hematopoiéticas humanas e um marcador de substituição para enxertia de células estaminais hematopoiéticas humanas.

Como mostrado na FIG. 1, os ratinhos irradiados que não receberam células não possuíam células que expressam CD45 humano na sua medula óssea no dia 60. Embora os camundongos que receberam apenas células do sangue do cordão umbilical mononucleares apresentassem um número substancial de células da medula óssea que expressavam CD45 humano, esse número mais do que triplicou Em camundongos que receberam células estaminais mesenquimais cultivadas a partir de geleia de Wharton ou células não cultivadas de geleia de Wharton. Surpreendentemente, 100.000 células estaminais não cultivadas da geleia de Wharton proporcionado um benefício igual a ou maior do que o benefício de 1.000.000 de células estaminais mesenquimatosas expandidas em cultura a partir de

geleia de Wharton, sugerindo que as células estaminais de geleia não cultivadas de Wharton podem ser mais do que dez vezes mais potente *in vivo* do que estaminais mesenquimatosas cultivadas Células. De fato, cerca de 10 000 células estaminais da geleia de Wharton não cultivadas foram quase tão efetivas como 1.000.000 de células estaminais mesenquimais cultivadas. Enquanto o mecanismo preciso para a eficácia reduzida de células estaminais mesenquimais em cultura é claro, minimamente manipulado, sem cultura de células estaminais de geleia de Wharton parecem ter vantagens terapêuticas importantes, *in vivo*.

Exemplo 4. Diferenças nos perfis de marcador de superfície celular

Células estaminais geleia de Wharton não cultivadas também são visivelmente diferentes ao nível molecular a partir de células estaminais mesenquimatosas cultivadas a partir de geleia de Wharton.

Os níveis de treze marcadores da superfície celular numa população de células estaminais de geleia não cultivadas de Wharton foram ensaiadas por anticorpo padrão/citometria de fluxo ensaios, e os resultados estão representados na FIG. 2. FIG. 2 fornece, para cada marcador testado, uma representação bidimensional padrão que mostra a porcentagem de células que demonstram um nível de expressão particular do marcador, conforme detectado pelo ensaio de anticorpos. Os resultados das células estaminais de geleia de Wharton não cultivadas são representados com uma linha escura, e os resultados de um controle são representados com uma linha mais clara. Conforme demonstrado, as células estaminais de geleia de Wharton não cultivadas apresentaram níveis mais elevados de CD49B, CD105, HLA-ABC, CD73, CD44, SSEA-4, CD29 e CD90 em comparação com o controle do antígeno. As células

estaminais da geleia de Wharton não cultivadas não demonstraram expressão substancial de CD34 e CD45, marcadores que seriam típicos das células hematopoiéticas, ou CD14, HLA-DR ou CD133.

A expressão dos mesmos marcadores foi testada em células estaminais mesenquimatosas cultivadas a partir de geleia de Wharton; Os resultados estão representados na FIG. 3. Conforme demonstrado, em comparação com o controle do antígeno, células estaminais mesenquimais cultivadas demonstraram níveis mais elevados de CD49B, CD105, HLA-ABC, CD44, CD29, CD73 e CD90; Uma gama mais ampla de níveis de expressão de SSEA-4; E a falta de CD14, CD34, CD45 e HLA-DR. Comparando a FIG. 2 e a FIG. 3, mesmo para marcadores como CD105 que são elevados tanto em células estaminais mesenquimatosas cultivadas quanto em células estaminais de geleia de Wharton não cultivadas, os padrões de expressão podem ser muito diferentes, já que os níveis de expressão observados nas células estaminais de geleia de Wharton não cultivadas se sobrepõem substancialmente ao controle do antígeno, enquanto que as células estaminais mesenquimais cultivadas ex vivo mostram níveis de expressão muito maiores com pouca sobreposição com o controle do antígeno. Assim, as células que foram purificadas da Geleia de Wharton sem cultura não são meramente particularmente potentes in vivo, elas também são marcadamente diferentes das células estaminais mesenquimais cultivadas e expandidas da geleia de Wharton, como evidenciado por seus padrões de marcadores de superfície celular.

REIVINDICAÇÕES

1. Um método de purificação células estaminais não cultivadas da geleia de Wharton, o método consiste em:

remoção de artérias e veias de um cordão umbilical compreendendo geleia de Wharton;
digestão do cordão umbilical por picação mecânica o cordão umbilical;
lavagem ou diluição do cordão umbilical digerido antes da sua separação do cordão umbilical não digerido;
separação do cordão umbilical digerido e não digerido;
sedimentação do cordão umbilical digerido por centrifugação;
filtragem do cordão umbilical digerido;
separação de células estaminais de geleia de Wharton não cultivadas do filtrado; e
congelamentos as células estaminais da geleia do não cultivadas de Wharton.

2. Um método de purificação de células estaminais de geleia de Wharton cultivadas e não cultivadas, o método compreende:

purificação de células estaminais não cultivadas da geleia de Wharton de acordo com o método da reivindicação 1; e
a cultura de células estaminais mesenquimatosas a partir do cordão umbilical não digerido.

3. O método da reivindicação 2, em que as células estaminais mesenquimais são cultivadas em cordão umbilical digerido.

4. Células estaminais não cultivadas da geleia de Wharton substancialmente livres de geleia semi-sólida de Wharton para uso em terapia, em que as células têm CD73 e CD105 reduzidas

em comparação com os níveis de células estaminais mesenquimatosas cultivadas a partir de geleia de Wharton.

5. As células estaminais de geleia de Wharton não cultivadas purificadas para uso de acordo com a reivindicação 4, em que as células estaminais de geleia de Wharton são mantidas numa solução estéril.

6. As células estaminais purificadas de geleia de Wharton não cultivadas purificadas para uso de acordo com a reivindicação 4 ou 5, em que as células estaminais geleia de Wharton são autólogas ou alogénicas para o indivíduo.

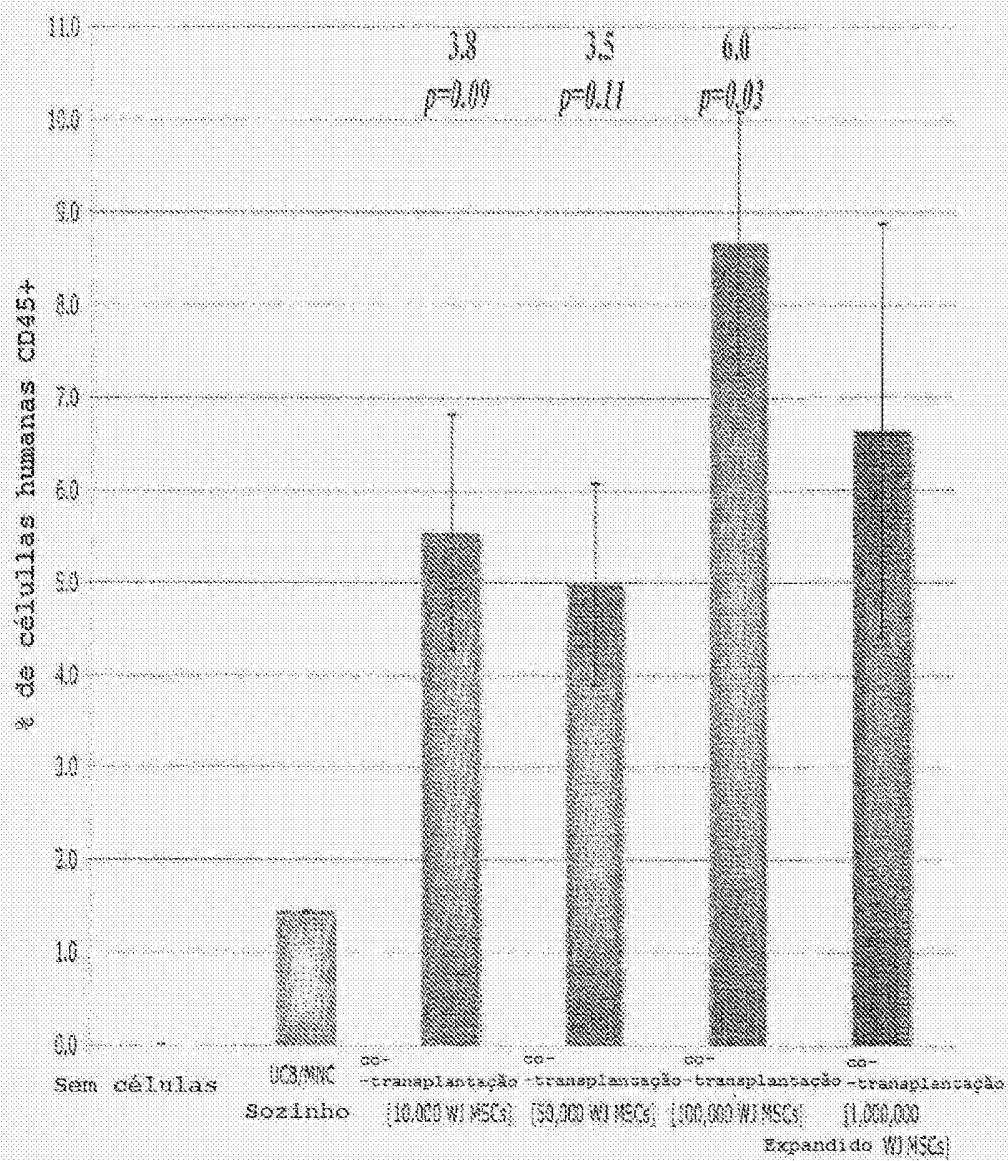


FIG. 1

Proteína de superfície celular/Perfil
 marcador de células estaminais
 mesenquimais derivadas do cordão
 umbilical minimamente manipuladas

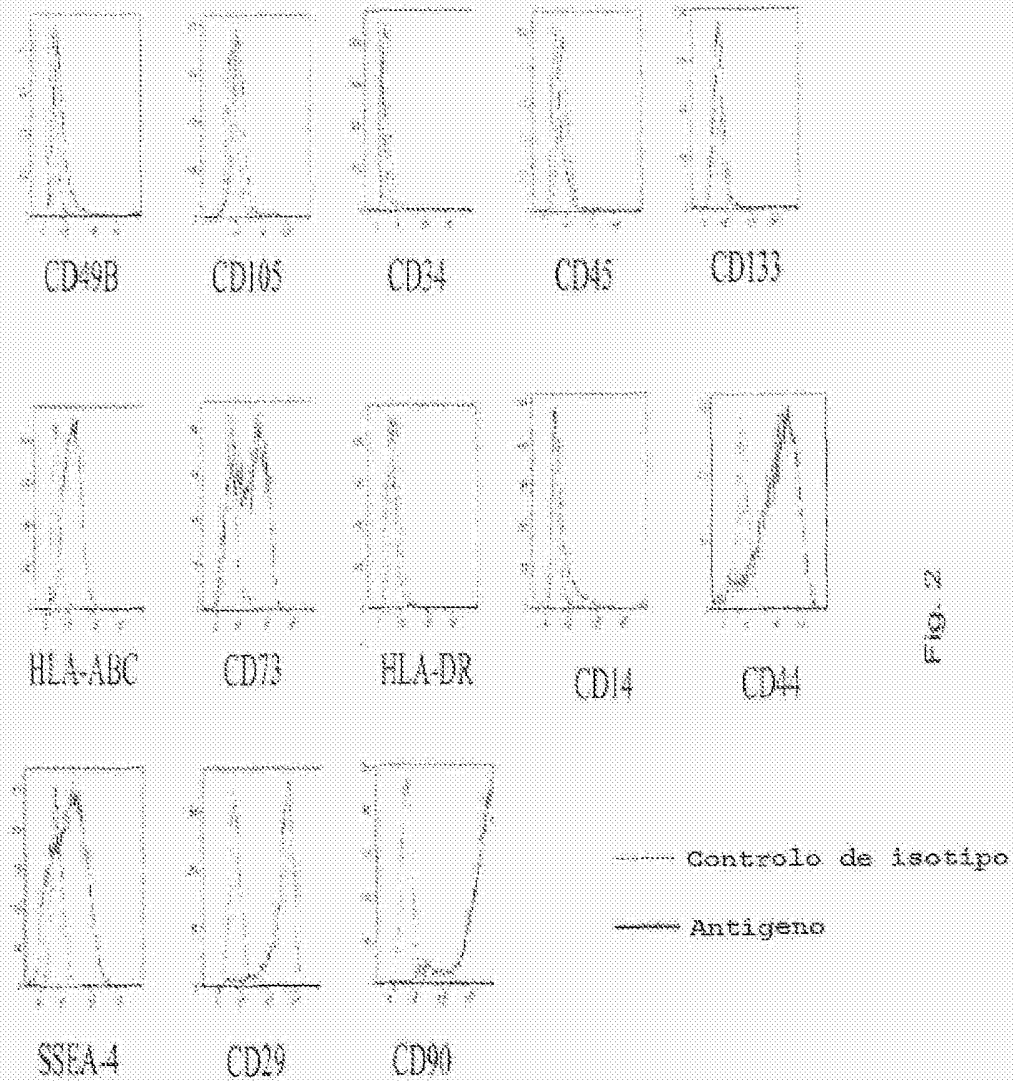


Fig. 2

Proteína de superfície celular / Perfil
 marcador de Ex Vivo células estaminais
 mesenquimais derivadas do cordão umbilical
 expandido

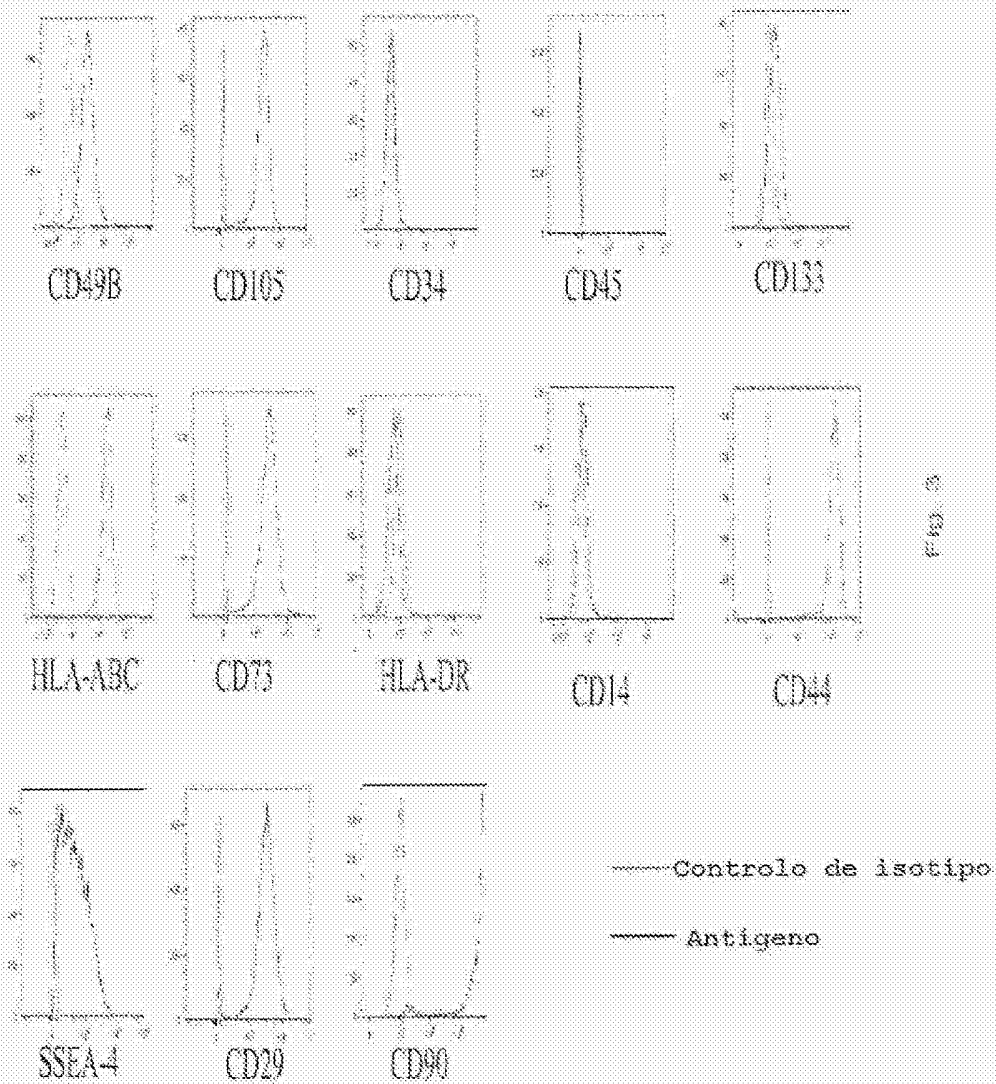


Fig. 9