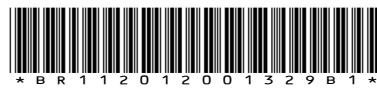




República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112012001329-7 B1



(22) Data do Depósito: 21/07/2010

(45) Data de Concessão: 13/04/2021

**(54) Título:** USO DE CÉLULAS PROGENITORAS ADULTAS MULTIPOTENTES (MAPCS), E, MÉTODOS PARA OBTER CÉLULAS PROGENITORAS ADULTAS MULTIPOTENTES (MAPCS) COM UMA POTÊNCIA DESEJADA E PARA AUMENTAR A POTÊNCIA DE CÉLULAS PROGENITORAS ADULTAS MULTIPOTENTES (MAPCS)

(51) Int.Cl.: C12N 3/00.

(30) Prioridade Unionista: 21/07/2009 US 61/227,309.

(73) Titular(es): ABT HOLDING COMPANY.

(72) Inventor(es): JULIANA MEGAN WODA; WOUTER VAN'T HOF.

(86) Pedido PCT: PCT US2010042726 de 21/07/2010

(87) Publicação PCT: WO 2011/011500 de 27/01/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 19/01/2012

**(57) Resumo:** USO DE CÉLULAS COM UMA POTÊNCIA DESEJADA, COMPOSIÇÃO, MÉTODOS PARA OBTER CÉLULAS COM UMA POTÊNCIA DESEJADA, PARA CONSTRUIR UM BANCO DE CÉLULAS, PARA DESCOBERTA DE DROGA E PARA AUMENTAR A POTÊNCIA DE CÉLULAS. A invenção é geralmente direcionada à redução de inflamação por meio de células que secretam fatores que reduzem a extravasão de leucócitos. Especificamente, a invenção é direcionada aos métodos usando células que secretam fatores que infra-regulam a expressão de moléculas de adesão celular em células endoteliais vasculares. Infra-regulação de expressão de moléculas de adesão celular reduz a adesão de leucócitos nas células endoteliais de tal modo que a extravasão é reduzida. O resultado final é uma redução de inflamação. As células são células não-germinativas não-embrionárias que têm características pluripotentes. Estas podem incluir expressão de marcadores pluripotenciais e amplo potencial de diferenciação.

USO DE CÉLULAS PROGENITORAS ADULTAS MULTIPOTENTES (MAPCs), E, MÉTODOS PARA OBTER CÉLULAS PROGENITORAS ADULTAS MULTIPOTENTES (MAPCs) COM UMA POTÊNCIA DESEJADA E PARA AUMENTAR A POTÊNCIA DE CÉLULAS PROGENITORAS ADULTAS MULTIPOTENTES (MAPCs)

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A invenção é geralmente direcionada à redução de inflamação por meio de células que secretam fatores que reduzem extravasão de leucócitos. Especificamente, a invenção é direcionada aos métodos usando células que secretam fatores que infra-regulam a expressão de moléculas de adesão celular em células endoteliais vasculares. A infra-regulação de expressão de moléculas de adesão celular reduz a adesão de leucócitos nas células endoteliais de tal modo que a extravasão é reduzida. O resultado final é uma redução de inflamação. Assim, a invenção fornece métodos para tratar condições patológicas associadas com um componente inflamatório indesejável, incluindo doença cardiovascular. A invenção também é direcionada aos métodos de descoberta de drogas para selecionar agentes que modulam a capacidade das células para infra-regularem a expressão de moléculas de adesão celular em células endoteliais. A invenção também é direcionada aos bancos de células que podem ser usados para fornecer células para administração a um sujeito, os bancos compreendendo células tendo uma potência desejada com respeito à infra-regulação da expressão de moléculas de adesão celular em células endoteliais e à redução de extravasão e de adesão de leucócitos. A invenção também é direcionada às composições compreendendo células de potências desejadas específicas. A invenção também é direcionada aos métodos diagnósticos conduzidos antes da administração das células, incluindo ensaios para avaliar a potência desejada das células a serem administradas. A invenção é adicionalmente direcionada aos ensaios diagnósticos de pós-tratamento para avaliar o efeito das células

sobre um sujeito sendo tratado. A invenção também é direcionada às células de uma potência desejada em composições farmacêuticas. As células são células não-germinativas não-embriionárias que têm características pluripotentes. Estas podem incluir a expressão de marcadores pluripotenciais e amplo potencial de diferenciação.

## FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

### Inflamação

[002] O processo de inflamação aguda é iniciado pelos vasos sanguíneos locais no tecido lesionado, que se alteram para permitir a exsudação de leucócitos e proteínas plasmáticos(as) para dentro do tecido circundante. O fluxo aumentado de fluido para dentro do tecido causa o inchamento característico associado com inflamação. Os vasos sanguíneos sofrem mudanças vasculares marcadas, incluindo vasodilatação, permeabilidade aumentada, e a diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo, que são induzidas pelas ações de mediadores inflamatórios. Permeabilidade aumentada dos vasos resulta no movimento do plasma para dentro de tecidos, com estase resultante devido ao aumento na concentração das células dentro do sangue. Estase permite que leucócitos marginem ao longo do endotélio, um processo crítico para seu recrutamento para dentro dos tecidos. Fluxo normal de sangue previne isto, porque a força cisalhante ao longo da periferia dos vasos move as células dentro do sangue para dentro do meio do vaso. As mudanças assim permitem a extravasão de leucócitos através do endotélio e da membrana basal constituindo o vaso sanguíneo. Uma vez dentro do tecido, as células migram ao longo de um gradiente quimiotático para alcançarem o sítio de lesão, onde elas podem tentar remover o estímulo e o reparo do tecido.

[003] Movimento de leucócitos do sangue para os tecidos através dos vasos sanguíneos é conhecido como extravasão, e pode ser dividido em numerosas etapas extensas:

(1) Localização e recrutamento de leucócitos para o endotélio local ao sítio de inflamação - envolvendo marginação e adesão nas células endoteliais: Recrutamento de leucócitos é mediado por receptor. Os produtos de inflamação, tal como histamina, promovem a expressão mediada de P-selectina sobre as superfícies de células endoteliais. Este receptor se liga fracamente em ligantes de carboidrato sobre as superfícies de leucócitos e faz com que eles “rolem” ao longo da superfície endotelial à medida que ligações são feitas e quebradas. Citocinas das células lesionadas induzem a expressão de E-selectina sobre células endoteliais, que funciona similarmente à P-selectina. Citocinas também induzem a expressão de ligantes de integrina sobre as células endoteliais, que adicionalmente tornam mais lentos os leucócitos. Estes leucócitos fracamente ligados estão livres para se desligarem se não ativados por quimiocinas produzidas em tecido lesionado. Ativação aumenta a afinidade de receptores de integrina ligados para ligantes sobre a superfície de célula endotelial, firmemente ligando os leucócitos no endotélio.

[004] (2) Migração através do endotélio, conhecida como transmigração, via o processo de diapedese: Gradientes de quimiocina estimulam os leucócitos aderidos para se moverem entre células endoteliais e passarem pela membrana basal para dentro dos tecidos.

[005] (3) Movimento de leucócitos dentro de tecido via quimiotaxia: Leucócitos alcançando o interstício de tecido se ligam nas proteínas de matriz extracelular via integrinas expressadas e CD44 para prevenir sua perda do sítio. Quimioatraentes fazem com que os leucócitos se movam ao longo de um gradiente quimiotáctico para a fonte de inflamação.

[006] Extravasão de leucócitos é o movimento de leucócitos para fora do sistema circulatório, para o sítio de dano ou de infecção de tecido. Este processo forma parte da resposta imune inata, envolvendo o recrutamento de leucócitos não-específicos. Monócitos também usam este processo na ausência de inflamação ou dano de tecido durante seu

desenvolvimento para macrófagos.

[007] Extravasão de leucócitos ocorre principalmente em vênulas pós-capilares, onde forças cisalhantes hemodinâmicas são minimizadas. Este processo pode ser entendido em várias etapas, descrito abaixo como “quimioatração”, “adesão com rolamento”, “adesão firme”, e “transmigração (endotelial)”. Tem sido demonstrado que o recrutamento de leucócitos é interrompido sempre que uma destas etapas é suprimida.

#### Quimioatração

[008] Sob reconhecimento de e adição por patógenos, os macrófagos residentes no tecido afetado liberam citocinas tais como IL-1, TNF- $\alpha$  e quimiocinas. IL-1 e TNF- $\alpha$  fazem com que as células endoteliais de vasos sanguíneos próximos do sítio de infecção expressem moléculas de adesão celular, incluindo selectinas. Leucócitos circulantes estão localizados próximos do sítio de lesão ou de infecção devido à presença quimiocina.

#### Adesão com rolamento

[009] Como velcro, ligantes de carboidrato sobre os leucócitos circulantes se ligam em moléculas de selectina sobre a parede interna do vaso, com afinidade marginal. Isto faz com que os leucócitos diminuam a velocidade e começem a rolar ao longo da superfície interna da parede do vaso. Durante este movimento de rolamento, ligações transitórias são formadas e quebradas entre selectinas e seus ligantes.

#### Adesão firme

[0010] Ao mesmo tempo, quimiocinas liberadas por macrófagos ativam os leucócitos rolantes e fazem com que moléculas de integrina comutem do estado padrão de afinidade baixa para o estado de afinidade alta. Isto é auxiliado por intermédio de ativação de sinalização *juxtacrine* de integrinas por quimiocinas e fatores solúveis liberados pelas células endoteliais. No estado ativado, as integrinas se ligam firmemente em receptores complementares expressados sobre as células endoteliais, com

afinidade alta.

### Transmigração

[0011] Os citoesqueletos dos leucócitos são reorganizados em uma tal maneira que os leucócitos são espalhados sobre as células endoteliais. Nesta forma, os leucócitos estendem pseudópodes e passam através dos vãos entre as células endoteliais. Transmigração do leucócito ocorre quando proteínas PECAM, encontradas sobre as superfícies de células endoteliais e de leucócitos, interagem e efetivamente puxam a célula através do endotélio. Os leucócitos secretam proteases que degradam a membrana basal, permitindo que eles escapem do vaso sanguíneo - um processo conhecido como diapedese. Uma vez no fluido intersticial, os leucócitos migram ao longo de um gradiente quimiotáctico para o sítio de lesão ou infecção.

[0012] Acúmulo de neutrófilos em sítios de inflamação é mediado por grupos específicos de moléculas de adesão celular incluindo as integrinas CD18 sobre os leucócitos e as selectinas (P- e E-selectinas sobre o endotélio e L-selectina sobre os leucócitos). Isto é suposto por estudos de pacientes com síndromes de deficiência de adesão de leucócito cujos leucócitos são geneticamente deficientes na expressão de ligantes de CD18 ou selectina-carboidrato (e.g., deficiência de adesão de leucócito de tipo II).

### Selectinas

[0013] Selectinas são expressadas logo após a ativação de citocina de células endoteliais por macrófagos de tecido. Células endoteliais ativadas inicialmente expressam moléculas de P-selectina, mas dentro de duas horas após a ativação a expressão de P-selectina é favorecida. Selectinas endoteliais se ligam em carboidratos sobre as glicoproteínas de transmembrana de leucócito, incluindo sialil-Lewis<sup>X</sup>.

[0014] P-selectinas: P-selectina é expressada sobre plaquetas e células endoteliais ativadas. Síntese de P-selectina pode ser induzida por trombina, leucotrieno B4, fragmento complementar C5a, histamina, TNF- $\alpha$  or LPS.

Estas citocinas induzem a externalização de corpos de Weibel-Palade em células endoteliais, apresentando P-selectinas pré-formadas sobre a superfície de célula endotelial. P-selectinas se ligam em PSGL-1 como um ligante.

[0015] E-selectinas: Molécula-1 de adesão de leucócito endotelial é expressada por células endoteliais estimuladas por citocina. Ela é considerada em ser responsável pelo acúmulo de leucócitos do sangue em sítios de inflamação por mediação da adesão de células no revestimento interno vascular. Exibe características estruturais homólogas àquelas de LYAM1, incluindo a presença de domínios lectina- e EGF-like seguidos por domínios de repetição de consenso curtos (*short consensus repeat*, SCR) que contêm 6 resíduos de cisteína conservados. Estas proteínas são parte da família selectina de moléculas de adesão celular (Watson et al., J. Exp. Med. 172: 263-272 (1990); Collins et al., J. Biol. Chem. 266: 2466-2473 (1991)). Síntese de E-selectina segue logo após a síntese de P-selectinas, induzida por citocinas tais como IL-1 e TNF- $\alpha$ . E-selectinas ligam-se em PSGL-1 e ESL-1.

[0016] L-selectinas: L-selectina são constitutivamente expressadas sobre alguns leucócitos, e conhecidamente se ligam em GlyCAM-1, MadCAM-1 e CD34 como ligantes.

[0017] Expressão suprimida de algumas selectinas resulta em uma resposta imune mais lenta. Se L-selectina não for produzida, a resposta imune poderá ser dez vezes mais lenta, porque P-selectinas (que também podem ser produzidas por leucócitos) ligam-se umas nas outras. P-selectinas podem se ligar umas nas outras com afinidade alta, mas ocorrem menos frequentemente porque a densidade de receptor-sítio é mais baixa d que as moléculas de E-selectina menores. Isto aumenta a velocidade de rolamento de leucócitos inicial, prolongando a fase de rolamento lento.

### Integrinas

[0018] Integrinas envolvidas em adesão celular são principalmente expressadas sobre leucócitos. Integrinas  $\beta 2$  sobre leucócitos rolando se ligam

em moléculas de adesão celular endotelial, parando o movimento celular.

[0019] LFA-1 é encontrada sobre leucócitos circulantes, e se liga em ICAM-1 e ICAM-2 sobre células endoteliais.

[0020] Mac-1 é encontrada sobre leucócitos circulantes, e se liga em ICAM-1 sobre células endoteliais.

[0021] VLA-4 é encontrada sobre leucócitos e células endoteliais, e facilita quimiotaxia; também se liga em VCAM-1.

[0022] Ativação celular via quimiocinas extracelulares faz com que as integrinas  $\beta 2$  sejam liberadas dos depósitos celulares. Moléculas de integrina migram para a superfície celular e se congregam em fragmentos de avidez alta. Domínios de integrina intracelular associam-se com o citoesqueleto de leucócito, via mediação com fatores citosólicos tais como talina,  $\alpha$ -actinina e vinculina. Esta associação causa um deslocamento conformacional na estrutura terciária de integrina, permitindo que o ligante acesse o sítio de ligação. Cátions divalentes (e.g.  $Mg^{2+}$ ) também são exigidos para ligação de ligante-integrina.

[0023] Ligantes-integrina ICAM-1 e VCAM-1 são ativados por citocinas inflamatórias, enquanto que ICAM-2 é constitutivamente expressada por algumas células endoteliais mas infra-regulada por citocinas inflamatórias. ICAM-1 e ICAM-2 compartilham dois domínios N-terminais homólogos; ambos podem se ligar em LFA-1.

[0024] Durante quimiotaxia, o movimento celular é facilitado pela ligação de integrinas  $\beta 1$  em componentes da matriz extracelular: VLA-3, VLA-4 e VLA-5 em fibronectina e VLA-2 e VLA-3 em colágeno e outros componentes da matriz extracelular.

### Citocinas

[0025] Extravasão é regulada pelo ambiente de fundo de citocina produzido pela resposta inflamatória, e é independente de antígenos celulares específicos. Citocinas liberadas na resposta imune inicial induzem

vasodilatação e abaixam a carga elétrica ao longo da superfície do vaso. Fluxo sanguíneo é tornado lento, facilitando a ligação intermolecular.

- [0026] IL-1 ativa linfócitos residentes e endotélios vasculares.
- [0027] TNF- $\alpha$  aumenta a permeabilidade vascular e ativa endotélios vasculares.
- [0028] CXCL8 (IL-8) forma um gradiente quimiotáctico que direciona os leucócitos para o sítio de lesão / infecção de tecido (CCL2 tem uma função similar à de CXCL8, induzindo extravasão de monócitos e seu desenvolvimento em macrófagos); também ativa integrinas de leucócito.
- [0029] Artigos de revisão resumindo o processo de extravasão em inflamação estão disponíveis. Veja Steeber, D. e Tedder, T., Immunologic Research, 22/2-3:299-317 (2000); Steeber et al., FSAEB J, 9:866-873 (1995); e Wagner, D. e Frenette, P., Blood, 111:5271-5281 (2008).
- [0030] CD15 (3-fucosil-N-acetil-lactosamina) é um grupo de antígeno de diferenciação - uma molécula imunologicamente significativa. CD 15 é uma molécula de adesão de carboidrato (não uma proteína) que pode ser expressada sobre glicoproteínas, glicolipídeos e proteoglicanos.
- [0031] CD 15 medeia fagocitose e quimiotaxia, encontrada sobre neutrófilos; expressada em pacientes com doença de Hodgkin, algumas leucemias linfocíticas crônicas de célula-B, leucemias linfocíticas agudas, e leucemias não-linfocíticas mais agudas. Também é chamada de Lewis-x e SSEA-1 (*stage specific embryonic antigen 1*, antígeno-1 embrionário estágio-específico) e representa um marcador para células-tronco pluripotentes murinas, nas quais desempenha um papel importante em adesão e migração das células na pré-implantação de embrião. É sintetizada por FUT4 (fucosil-transferase 4) e FUT9.

### CD15s

- [0032] O determinante oligossacarídeo sialil-Lewis x é um componente essencial de contra-receptores de leucócito para adesões de

leucócitos mediadas por E-selectina e P-selectina. Esta molécula de oligossacarídeo é exibida sobre as superfícies de granulócitos, monócitos, e células exterminadoras naturais. Formação de adesão de leucócito nestas selectinas é uma etapa inicial e importante no processo que finalmente permite que leucócitos deixem a árvore vascular e se tornem recrutados para dentro de tecidos linfóides e sítios de inflamação. Natsuka et al., J. Biol. Chem. 269: 16789-16794 (1994) e Sasaki et al., J. Biol. Chem. 269: 14730-14737 (1994) isolaram cDNAs codificadores de uma alfa-1,3-fucosil-transferase, FUT7, de leucócito de humano, capaz de sintetizar o determinante sialil-Lewis x.

[0033] Natsuka et al. verificaram que quando FUT7 era expressada em células de mamífero, o cDNA direcionou a síntese de grupos sialil-Lewis x de superfície celular, mas não de determinantes Lewis x, Lewis A, sialil-Lewis a, ou VIM-2. Sasaki et al. demonstrara capacidade *in vivo* de FUT7 para sintetizar o grupo sialil-Lewis x que se liga em E-selectina e relataram a expressão restrita de FUT7 em leucócitos.

[0034] Chen et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 103:16894-16899 (2006) observaram que células-T ativadas, particularmente células Th1, expressam sialil-Lewis x, mas não células-T latentes. Usando análise de repórter, mostraram que TBET promoveu e GATA3 reprimiu a transcrição de FUT7. TBET interferiu com a ligação de GATA3 em seu DNA alvo, mas GATA3 também interferiu com a ligação de TBET no promotor FUT7. GATA3 regulou a transcrição de FUT7 por recrutamento, em uma maneira dependente de fosforilação, histona desacetilase-3 e HDAC5 e por competição com CBP/p300 em ligação na terminação N de TBET. Expressão máxima de FUT7 e sialil-Lewis x em células-T foi obtida por supressão ROG-mediada de GATA3. Chen et al. (2006) concluíram que o complexo de fator de transcrição GATA3/TBET regula a expressão linhagem-celular-específica de receptores guia (*homing receptors*) em linfócito e que glicoconjugados são

regulados por este complexo para realizar a expressão linhagem-celular-específica em subconjuntos de linfócitos Th1 e Th2.

[0035] Ligante selectina P, ou ligante glicoproteína P-selectina (*P-selectin glycoprotein ligand, PSGL1*), é o contra-receptor de afinidade alta para P-selectina sobre células mieloides e linfócitos T estimulados. Como tal, desempenha um papel crítico na fixação destas células em plaquetas ativadas ou endotélios expressando P-selectina.

[0036] Baseado em análise por citometria de fluxo, immunoblot, e em câmara de fluxo, Fuhlbrigge et al., Nature 389: 978-981 (1997) propuseram que modificação diferencial após tradução de PSGL1, mediada por fucosil-transferase-7, regula a expressão do antígeno associado com linfócito cutâneo (*lymphocyte-associated antigen, CLA*), que se liga em ambas P-selectina e E-selectina, em células-T. Células-T positivas para CLA são células-T de memória guia (*homing*) em pele que são definidas por sua reatividade com anticorpo monoclonal HECA-452. Células-T positivas para se infiltram em lesões de pele em numerosos distúrbios inflamatórios, incluindo psoríase.

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0037] A invenção é amplamente direcionada a um método para reduzir inflamação.

[0038] A invenção é mais especificamente direcionada a um método para reduzir extravasão de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, e monócitos).

[0039] A invenção é mais especificamente direcionada a um método para reduzir a infiltração de leucócitos do sistema circulatório para dentro de tecidos circundantes.

[0040] A invenção também é direcionada a um método para reduzir a adesão de leucócitos em um vaso sanguíneo.

[0041] A invenção também é direcionada a um método para reduzir a adesão de leucócitos em endotélio vascular.

[0042] A invenção também é direcionada a um método para a adesão

de leucócitos em células endoteliais na parede de vaso sanguíneo.

[0043] A invenção também é direcionada a um método para infra-regular a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais.

[0044] A invenção também é direcionada a um método para reduzir a ativação de células endoteliais.

[0045] A invenção também é direcionada a um método para reduzir a ativação celular no endotélio vascular.

[0046] Ativação de célula endotelial pode resultar da exposição a uma citocina inflamatória. Citocinas incluem, mas não são limitadas a, fator- $\alpha$  de necrose tumoral (*tumor necrosis factor- $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), anfíregulina, LPS e outros ligantes de receptor Toll-like (peptídeos patogênicos tal como fMLP, peptídeos de tecidos danificados, tais como fragmentos de fibronecina) trombina, histaminas, radicais de oxigênio, e IFN- $\gamma$ . No contexto da invenção, ativação envolve supra-regulação de moléculas de adesão celular em células endoteliais vasculares.

[0047] A invenção também é direcionada a um método para reduzir a capacidade de células endoteliais em parede de vaso sanguíneo para se ligarem em um ligante ou grupo de adesão sobre um leucócito. Estes incluem, mas não são limitados a, PSGL-1, ESL-1, CD15s,  $\alpha$ 4-integrinas, CD44,  $\beta$ 2-integrinas, L-selectina, CD99, e JAMs.

[0048] Leucócitos incluem, mas não são limitados a, neutrófilos, monócitos, e linfócitos. Linfócitos incluem Células-B e células-T. Células-T incluem células CD4 $^{+}$ , CD8 $^{+}$ ,  $\gamma\delta$ T, e células exterminadoras naturais.

[0049] Moléculas de adesão celular expressadas em células endoteliais e sujeitas à infra-regulação incluem, mas não são limitadas a, E-selectina, VCAM, ICAM (1, 2), P-selectina, CD99, PECAM-1, JAMs, ESAM, e osteopontina (co-receptor para VCAM).

[0050] Em uma modalidade, I-CAM e P-selectina são supra-reguladas sobre células endoteliais em um sujeito tendo uma lesão cerebral traumática.

[0051] A invenção é direcionada à redução de expressão de molécula de adesão celular. Expressão pode ser tanto intracelular quanto extracelular, tal como sobre a superfície de célula endotelial. Consequentemente, expressão pode ser reduzida de tal modo que haja uma redução de secreção destas moléculas para dentro do meio de cultura celular quando células endoteliais estão em cultura. Expressão em superfície celular e extracelular inclui reduzir a expressão em nível de proteína. Expressão intracelular inclui reduzir tanto transcrição quanto tradução dentro da célula.

[0052] De acordo com esta invenção, a redução de todos os efeitos acima (i.e., inflamação, extravasão, adesão de leucócitos em células endoteliais, expressão de moléculas de adesão, etc.) é realizada por meio de exposição dos leucócitos e/ou das células endoteliais a uma célula não-germinativa não-embriônica tendo algumas das características pluripotenciais de uma célula-tronco embrionária mas derivada de tecido não-embriônário.

[0053] De acordo com esta invenção, todos os efeitos acima podem ser realizados pela administração de células ou de meio condicionado pelas células. As células incluem, mas não são limitadas a, células não-germinativas não-embriônicas tendo características de células-tronco embrionárias, mas sendo derivadas de tecido não-embriônário. Tais células podem ser pluripotentes e expressar marcadores de pluripotência, tais como um ou mais de oct4, telomerase, rex-1, rox-1, sox-2, nanog, SSEA-1 e SSEA-4. Outras características de pluripotência incluem a capacidade para diferenciar em tipos de células de mais do que uma camada germinativa, tais como duas ou três camadas germinativas embrionárias ectodermal, endodermal, e mesodermal. Tais células podem ou não estar imortalizadas ou transformadas em cultura. Tais células podem ser elevadamente expandidas sem serem transformadas e também manter um cariotipo normal. Por exemplo, em uma modalidade, as células não-germinativas não-embriônicas podem ter sofrido pelo menos 10-40 duplicações celulares, tais como 30, 40, 50, 60, ou mais,

sendo que as células não estão transformadas e têm um cariótipo normal. As células podem expressar atividade de telomerase de modo que sejam capazes de realizarem mais do que 30 duplicações de população (duplicações celulares), tais como 35, 40, 45, 50, ou mais. Contudo, como observado acima, as células poderiam adicionalmente expressar um ou mais de oct4, telomerase, rex-1, rox-1, sox-2, nanog, SSEA1, or SSEA4. Tais células podem se diferenciar em pelo menos um tipo de célula de cada uma das linhagens embrionárias endodermal, ectodermal, e mesodermal e podem incluir diferenciação em todas as três. Ademais, podem ou não ser tumorigênicas, tal como não produtoras de teratomas. Se as células são transformadas ou tumorigênicas, e se for desejado usá-las para infusão, tais células podem ser desativadas de modo que não possam formar tumores in vivo, como pelo tratamento que previne a proliferação celular em tumores. tais tratamentos são bem conhecidos na arte. Tais células podem naturalmente realizar os efeitos aqui (i.e., não geneticamente ou farmaceuticamente modificadas para realizar isto). Contudo, expressores naturais podem ser geneticamente ou farmaceuticamente modificados para aumentar a potência.

[0054] Em vista da potência destas células para realizar os efeitos acima, as células podem ser usadas em métodos de descoberta de drogas para selecionar um agente que modula a capacidade das células para realizarem qualquer um dos efeitos acima. Tais agentes incluem, mas não são limitados a, moléculas orgânicas pequenas, ácidos nucleicos de anti-senso, aptâmeros de siRNA DNA, peptídeos, anticorpos, proteínas de não-anticorpo, citocinas, quimiocinas, e quimioatraentes. O agente também pode ser utilizado para aumentar a potência das células para realizarem qualquer um dos efeitos acima.

[0055] Como um exemplo, este ensaio tem sido usado para identificar um pré-tratamento das células com TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , ou IL-1 $\beta$ , ou uma sua combinação, para produzir células que inibem a supra-regulação de moléculas

de célula endotelial ou a infra-regulação de expressão destas moléculas. Algumas células precisam ser co-cultivadas com células endoteliais ativadas com o propósito de produzir os fatores que infra-regulam a expressão das moléculas de adesão (ou inibem a supra-regulação). Consequentemente, células inexperientes (não expostas às células endoteliais ativadas) podem ser expostas aos agentes desejados e então ensaiadas para o efeito sobre ativação de célula endotelial, expressão de grupos de adesão, ou qualquer um dos efeitos acima.

[0056] Devido ao fato de os efeitos descritos neste pedido poderem ser causados por fatores secretados das células, não apenas as células, mas meio condicionado produzido da cultura das células, são / é úteis (útil) para realizar os efeitos. Tal meio conteria os fatores secretados e, portanto, poderia ser usado no ligar das células ou adicionado nas células. Assim, se as células puderem ser usadas, deve ser entendido que o meio também seria efetivo e poderia ser substituído ou adicionado.

[0057] Em vista da propriedade destas células para realizarem os efeitos acima, bancos de células podem ser estabelecidos contendo células que são selecionadas para terem uma potência desejada para realizarem os efeitos acima. Consequentemente, a invenção inclui ensaiar tais células para a capacidade de realizar qualquer um dos efeitos acima e selecionar e preparar banco de células tendo uma potência desejada. O banco fornece uma fonte para preparar uma composição farmacêutica para administrar ao sujeito. Células podem ser usadas diretamente do banco ou expandidas antes do uso.

[0058] Consequentemente, a invenção também é direcionada aos procedimentos diagnósticos conduzidos antes da administração destas células a um sujeito, aos procedimentos pré-diagnósticos incluindo avaliação da potência das células para realizarem um ou mais dos efeitos acima. As células podem ser obtidas de um banco de células e usadas diretamente ou expandidas antes da administração. Em qualquer caso, as células seriam

avaliadas para a potência desejada. Ou as células podem ser derivadas do sujeito e expandidas antes da administração. Neste caso, também, as células poderiam ser avaliadas para a potência desejada antes da administração.

[0059] Embora as células selecionadas para efetividade sejam necessariamente ensaiadas durante o procedimento de seleção, pode ser preferível e prudente de novo ensaiar as células antes da administração a um sujeito para tratamento para garantir que as células ainda sejam efetivas em níveis desejados. Isto é particularmente preferível se as células estiverem depositadas por qualquer duração de tempo, tal como em um banco de células, onde as células estão mais provavelmente congeladas durante o depósito.

[0060] Com respeito aos métodos de tratamento com as células, entre o isolamento original das células e a administração a um sujeito, pode haver ensaios múltiplos (i.e. sequenciais) para modulação. Isto é para garantir que as células ainda possam realizar o efeito em níveis desejados após manipulações que ocorrem dentro deste período de tempo. Por exemplo, um ensaio pode ser realizado após cada expansão das células. Se as células estiveram em um banco de células, elas podem ser ensaiadas após serem liberadas do depósito. Se elas estiverem congeladas, podem ser ensaiadas após descongelamento. Se as células de um banco de células estão expandidas, podem ser ensaiadas após a expansão. Preferivelmente, uma porção do produto celular final (que é fisicamente administrada ao sujeito) pode ser ensaiada.

[0061] A invenção também é direcionada a um método para estabelecer a dosagem de tais células por avaliação da potência das células para realizarem um ou mais dos efeitos acima.

[0062] A invenção adicionalmente inclui ensaios diagnósticos de pós-tratamento, após a administração das células para avaliar eficácia. Os ensaios diagnósticos incluem, mas não são limitados a qualquer um dos efeitos aqui descritos que são capazes de serem ensaiados de um sujeito.

[0063] A invenção também é direcionada às composições compreendendo uma população das células tendo uma potência desejada. Tais populações podem ser encontradas como composições farmacêuticas adequadas para administração a um sujeito e/ou em bancos de células dos quais as células podem ser usadas diretamente para administração a um sujeito ou expandidas antes da administração.

[0064] Os métodos e as composições da invenção são úteis para tratar qualquer doença envolvendo inflamação, onde um componente daquela inflamação envolve adesão de leucócitos em células endoteliais vasculares por meio de moléculas de adesão celular. Isto inclui condições agudas e crônicas em infarto cardiovascular, e.g., infarto miocardial agudo; lesão do sistema nervoso, e.g., derrame cerebral, lesão cerebral traumática; lesão na medula espinhal; doença vascular periférica; doença pulmonar , e.g., asma, ARDS; doença autoimune, e.g., artrite reumatóide, esclerose múltipla; psoríase; doença gastrointestinal, e.g., doença de enxerto-versus-hospedeiro, doença de Crohn.

[0065] É entendido, contido, que para o tratamento de qualquer uma das condições acima, pode ser conveniente usar tais células; isto é, uma que tenha sido ensaiada para um ou mais dos efeitos aqui descritos e selecionada para um nível desejado de efetividade antes da administração para tratamento da condição.

### DESCRIÇÃO BREVE DAS FIGURAS

[0066] Figura 1: MultiStem modula E-selectina, supra-regulação de V-CAM e I-CAM por TNF- $\alpha$  em células endoteliais aórticas de humano (human aortic endothelial cells, HAEC). (A) Após o crescimento das células para próximo da confluência, células endoteliais foram ativadas com TNF- $\alpha$  por 72 horas sozinhas ou em co-cultura com MultiStem. Células foram então analisadas por citometria de fluxo ou PCR para expressão de E-Selectina, V-CAM ou I-CAM. (B-E) Expressão em superfície de molécula de adesão

celular endotelial induzida por TNF- $\alpha$  é decrescida na presença de MultiStem em uma maneira dependente de dose de. HAEC mostram supra-regulação em superfície celular de expressão de E-selectina (B,C), V-CAM (D) e I-CAM (E) quando co-cultivadas com MultiStem na presença de TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) por 72 horas. O número de células expressando E-selectina e V-CAM foi determinado e expressado como uma percentagem do número total de células induzidas para expressarem estes marcadores com TNF- $\alpha$ . Para I-CAM, todas as células tiveram algum nível de expressão mesmo antes da ativação. Portanto, a força de sinal por célula foi calculada e os dados são expressados como uma percentagem do sinal induzido por TNF- $\alpha$ .

[0067] Figura 2: MultiStem inibe a supra-regulação de molécula de adesão em superfície celular em células endoteliais pulmonares de humano (*human pulmonary endothelial cells HPMEC*) ou por IL-1 $\beta$  (A) HPMEC mostram supra-regulação reduzida em superfície celular de expressão de E-Selectina, V-CAM, e I-CAM quando co-cultivadas com MultiStem na presença de TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) por 72 horas, similar às HAEC. Expressão em superfície celular foi medida por FACS. (B) Indução dos marcadores de superfície celular por outra citocina pró-inflamatória, IL-1 $\beta$ , também foi reduzida em HAEC pela co-cultura com MultiStem.

[0068] Figura 3: MultiStem regula a supra-regulação de molécula de adesão celular em níveis transcricionais. (A) Níveis de E-selectina solúvel (*soluble E-selectin, sE-selectina*) foram medidos nos meios das co-culturas de MultiStem e células endoteliais (HAEC ou HPMEC) por ELISA. (B) mRNA foi isolado de HAEC após co-cultura de 72 h na ausência ou presença de TNF- $\alpha$  com doses celulares diferentes de MultiStem. RT-PCR quantitativa foi realizada para E-selectina, V-CAM, I-CAM e GAPDH. MultiStem reduziu a expressão de mRNA de E-selectina, V-CAM e I -CAM induzida por TNF- $\alpha$  em comparação com as células de controle não tratadas.

[0069] Figura 4: Diferente de MultiStem. MSC não inibe a expressão

em superfície celular de moléculas de adesão em células endoteliais sob ativação com TNF- $\alpha$ . (A-C) Expressão, induzida por TNF- $\alpha$ , em superfície de molécula de adesão celular endotelial não é modificada na presença de MSC, enquanto que a co-cultura com MultiStem reduz a expressão de molécula de adesão. HAEC não mostram mudança em supra-regulação em superfície celular de expressão de E-selectina, V-CAM e I-CAM quando co-cultivadas com MSC na presença de TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) por 72 horas.

[0070] Figura 5: Adesão de neutrófilos em células endoteliais co-cultivadas na presença de TNF- $\alpha$  e MultiStem é reduzida em comparação com a ligação em células endoteliais incubadas com apenas TNF- $\alpha$ . (A) Após incubação de 72 horas sozinhas ou com MultiStem, células endoteliais ativadas e inativadas foram incubadas com neutrófilos ativados por 1 minuto. Células foram lavadas, e fotografadas. O número de neutrófilos ligados foi determinado por fotografia de cada condição três vezes e contando o número de neutrófilos ligados em cada campo de potência alta (10X). (B) O número de neutrófilos ligados em células endoteliais co-cultivadas com MultiStem foi significativamente reduzido em comparação com as células endoteliais de controle. (C) Fotografias representativas ilustrando ligação de neutrófilos reduzida em células endoteliais em co-cultura com MultiStem.

[0071] Figura 6: Infiltração de neutrófilos é significativamente reduzida em corações tratados com MultiStem em comparação com corações tratados com veículo três dias após = AMI. (A) Infarto miocárdico agudo foi induzido por ligação permanente de LAD. Todos os ratos receberam AMI seguido por injeção direta de quer controle de veículo (PBS) que MultiStem de rato (10 Milhões de células). Infiltração de neutrófilos foi medida por células exibindo coloração de elastase em seções do coração de animais tratados e não tratados. Tabela 1 mostra o número médio de células positivas para elastase de cada animal (4 seções foram examinadas por animal). (B) Infiltração de neutrófilos foi medida por coloração de elastase. O grupo de

controle teve níveis significativamente mais altos de coloração de elastase (35,25 PMS/hpf) em comparação com os animais tratados com MultiStem (12,185 PMN/hpf) três dias após a cirurgia ( $p=0,005823$ ) (C). Visões representativas de níveis de neutrófilos (medidos por coloração de elastase) em animais tratados com MultiStem e animais não tratados.

[0072] Figura 7: Etapas sequenciais múltiplas mediando recrutamento de leucócitos durante inflamação. Leucócitos são capturados e começam a rolar sobre P- e E-selectinas e seus ligantes ligante-1 de glicoproteína P-selectina (*P-selectin glycoprotein ligand-1*, PSGL-1) e ligante-1 de E-selectina (*E-selectin ligand-1*, ESL-1). Alguns leucócitos tais como linfócitos ou células progenitoras e tronco hematopoiéticas também rolam sobre uma integrina  $\alpha 4$  e seu receptor endotelial molécula-1 de adesão de célula vascular (*vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1). L-selectina é crítica para rolamento de linfócito sobre HEVs em tecidos linfóides. À medida que a inflamação progride, a velocidade de rolamento de leucócito diminui, permitindo a integração de sinais de ativação de ligantes de selectina e receptores acoplados em proteína G (*G-protein-coupled receptors*, GPCRs). Estes sinais de ativação acarretam a polarização de leucócitos rolando lentamente e o agrupamento de L-selectina e PSGL-1 em um polo maior que permite recrutamento adicional de leucócitos através de ligações secundárias via interações de leucócito-leucócito. Ativação de leucócito intensifica a avidez e a afinidade de integrina, acarretando a adesão firme sobre molécula-1 de adesão intercelular (*intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1) expressada sobre células endoteliais. Leucócitos aderentes continuamente migram lateralmente para inspecionar a microvasculatura e pesquisar sítios para transmigração. Leucócitos podem transmigrar de modo classificado através das vias (paracelulares) juncionais dentre moléculas de adesão juncionais (*junctional adhesion molecules*, JAMs), CD99 e molécula-1 de adesão de célula endotelial / plaqueta (*platelet/endothelial-cell adhesion*

*molecule-1*, PECAM-1), molécula de adesão seletiva de célula endotelial (*endothelial cell-selective adhesion molecule*, ESAM), ou alternativamente por meio da via de célula endotelial (via transcelular).

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0073] Deve ser entendido que esta invenção não é limitada à metodologia, aos protocolos, e aos reagente específica(os), etc., aqui descrita(os) e, como tais, podem variar. A terminologia aqui usada é apenas para o propósito de descrever modalidades específicas, e não é intencionada para limitar o escopo da invenção relevada, que é definido apenas pelas reivindicações.

[0074] Os cabeçalhos de seção são aqui usados apenas para propósitos de organização e não são para serem entendidos em nenhuma maneira como limitantes do tema descrito.

[0075] Os métodos e as técnicas do presente pedido são geralmente realizados de acordo com métodos convencionais bem conhecidos na arte e como descritos em várias das referências gerais e mais específicas que são citadas e discutidas em todo o presente relatório descritivo salvo indicação em contrário. Veja, e.g., Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) e Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), e Harlow e Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990).

#### Definições

[0076] “Um” ou “uma” significa aqui um(a) ou mais do que um(a); pelo menos um(a). Onde a forma no plural for aqui usada, ela geralmente inclui o singular.

[0077] Como aqui usados, os termos “adere(m)”, “aderência”, “adesão”, e semelhantes, referem-se *in vivo*, a uma associação de leucócitos e

células endoteliais suficiente para resultar em extravasão. Dentro do contexto da invenção a aderência que é reduzida ou evitada pelos reagentes da invenção é aquela que ocorre com suficiência. Em aplicações in vitro, o grau (avidez) de aderência pode não estar necessariamente naquele nível. Por exemplo, no contexto de descoberta de droga, pode-se desejar detectar adesão (ligação) com uma avidez que é de uma ordem menor.

[0078] Um “banco de células” é nomenclatura industrial para células que têm sido crescidas e depositadas para uso futuro. Células podem estar depositadas em alíquotas. Podem ser usadas diretamente do depósito ou podem ser expandidas após o depósito. Isto é uma conveniência de modo que haja células “fora da prateleira” disponíveis para administração. As células podem já estar depositadas em um excipiente farmaceuticamente aceitável de modo que elas possam ser diretamente administradas ou possam ser misturadas com um excipiente apropriado quando forem liberadas do depósito. Células podem ser congeladas ou diferentemente depositadas em uma forma para preservar a viabilidade. Em uma modalidade da invenção, são produzidos bancos de células nos quais as células têm sido selecionadas para potência intensificada para realizar um ou mais dos efeitos, tais como redução de expressão de uma ou mais moléculas de adesão. Após a liberação do depósito, e antes da administração ao sujeito, pode ser preferível de novo ensaiar as células para potência. Isto pode ser feito usando qualquer um dos ensaios, diretos ou indiretos, descritos neste pedido ou diferentemente conhecidos na arte. Então as células tendo a potência desejada podem ser então administradas ao sujeito para tratamento.

[0079] “Co-administrar” significa administrar conjuntamente com um outro, junto, coordenadamente, incluindo administração simultânea ou sequencial de dois ou mais agentes.

[0080] “Compreendendo” significa, sem outra limitação, incluindo o referente, necessariamente, sem qualquer qualificação ou exclusão sobre o

que mais pode ser incluído. Por exemplo, “uma composição compreendendo x e y” inclui qualquer composição que contém x e y, não importando quais outros componentes possam estar presentes na composição. Igualmente, “um método compreendendo a etapa de x” inclui qualquer método no qual x é realizada, seja x a única etapa no método seja ela apenas uma das etapas, não importando quantas outras etapas podem haver e não importando quanto simples ou complexa x é em comparação com elas. “Compreendido(a) de” e frases usando palavras da raiz “compreender” são aqui usadas como sinônimos de “compreendendo” e têm o mesmo significado.

[0081] “Compreendido(a) de” é um sinônimo de compreendendo (veja acima).

[0082] “Meio de cultura celular condicionado” é um termo bem conhecido na arte e se refere ao meio no qual as células têm sido crescidas. Aqui isto significa que as células estão crescidas por um tempo suficiente para secretarem os fatores que são efetivos para realizar qualquer um dos resultados descritos neste pedido, incluindo redução da expressão de moléculas de adesão celular; redução de adesão de leucócitos em células endoteliais; redução de extravasão, etc.

[0083] Meio de cultura celular condicionado refere-se ao meio no qual células têm sido cultivadas de modo a secretarem fatores para dentro do meio. Para os propósitos da presente invenção, células podem ser crescidas por intermédio de um número suficiente de divisões celulares de modo a produzirem quantidades efetivas de tais fatores de maneira que o meio reduza a expressão de moléculas de adesão celular de modo a reduzir a adesão de leucócitos e, consequentemente, reduzir extravasão, etc. Células são removidas do meio por qualquer um dos métodos conhecidos na arte, incluindo, mas não limitados a, centrifugação, filtração, imunodepleção (e.g., via anticorpos etiquetados e colunas magnéticas), e fracionamento celular ativado por fluorescência (*fluorescent activated cell sorting*, FACS).

[0084] “Decrescer” ou “reduzir” significa diminuir o efeito ou preveni-lo inteiramente, tal como reduzir a extravasão de leucócitos, a adesão de leucócitos, a expressão de grupo de adesão de leucócitos, ou qualquer um dos efeitos aqui descritos.

[0085] “Células EC” foram descobertas da análise de um tipo de câncer chamado de um teratocarcinoma. Em 1964, pesquisadores observaram que uma célula única em teratocarcinomas poderia ser isolada e permaneceria indiferenciada em cultura. Este tipo de célula-tronco tornou-se conhecido como uma célula de carcinoma embrionária (*embryonic carcinoma cell, EC cell, célula EC*).

[0086] “Quantidade efetiva” geralmente significa uma quantidade que fornece o efeito sistêmico ou local desejado, e.g. efetivo para melhorar os efeitos indesejáveis de inflamação pela realização da adesão que acarreta extravasão. Por exemplo uma quantidade efetiva é uma quantidade suficiente para efetuar um resultado clínico desejado ou benéfico. As quantidades efetivas podem ser fornecidas todas de uma vez em uma única administração ou em quantidades fracionárias que fornecem a quantidade efetiva em várias administrações. A determinação precisa de qual seria considerada uma quantidade efetiva pode ser baseada em fatores individuais para cada sujeito, incluindo seu tamanho, sua idade, sua lesão, e/ou sua doença ou lesão sendo tratada, e a quantidade de tempo desde que a lesão ocorreu ou a doença começou. Uma pessoa experiente na arte será capaz de determinar a quantidade efetiva para um determinado sujeito baseado nestas considerações que são rotineiras na arte. Como aqui usada, “dose efetiva” significa o mesmo que “quantidade efetiva”.

[0087] “Rota efetiva” geralmente significa uma rota que fornece liberação de um agente a um(a) compartimento, sistema ou localização desejado(a). Por exemplo, uma rota efetiva é uma através da qual um agente pode ser administrado para fornecer no sítio de desejado uma quantidade do

agente suficiente para efetuar um resultado clínico desejado ou benéfico.

[0088] “Células-tronco embrionárias (*embryonic stem cells*, ESC)” são conhecidas na arte e têm sido preparadas a partir de muitas espécies diferentes de mamíferos. Células-tronco embrionárias são células-tronco derivadas da massa de célula interna de um embrião no estágio inicial conhecido como um blastocisto. Elas são capazes de se diferenciarem em todos os derivados das três camadas germinativas primárias: ectoderma, endoderma, e mesoderma. Estas incluem cada um de mais do que 220 tipos de células no corpo adulto. As células ES podem se tornar qualquer tecido no corpo, excluindo a placenta. Apenas as células da mórula são totipotentes, capazes de se tornarem todos os tecidos e uma placenta. Algumas células similares às ESCs podem ser produzidas por transferência nuclear de um núcleo de célula somática para dentro de um óvulo fertilizado enucleado.

[0089] “Extravasão” refere-se ao vazamento de um fluido para fora de seu recipiente. No caso de inflamação, se refere ao movimento de células brancas do sangue dos capilares para os tecidos circundando-os. Isto também é discutido nos Fundamentos da invenção.

[0090] Uso do termo “inclui” não é intencionado para ser limitante.

[0091] “Aumentar”, “aumenta” ou “aumentando” significa induzir inteiramente onde não há efeito pré-existente ou aumentar o grau do efeito, tal como extravasão de leucócitos, adesão de leucócitos, expressão de grupo de adesão, ou qualquer um dos efeitos aqui descritos.

[0092] “Células-tronco pluripotentes induzidas (*induced pluripotent stem cells*, iPSC ou células IPS)” são células somáticas que têm sido reprogramadas, por exemplo, por introdução de genes exógenos de modo que concedem à célula somática um fenótipo menos diferenciado. Estas células podem então ser induzidas para se diferenciarem em progénie menos diferenciada. Células IPS têm sido derivadas usando modificações de uma abordagem originalmente descoberta em 2006 (Yamanaka, S. et al., Cell Stem

Cell, 1:39-49 (2007)). Por exemplo, em uma situação, para preparar células IPS, os cientistas iniciaram com células de pele que foram então modificadas por uma técnica laboratorial padrão usando retrovírus para inserir genes no DNA celular. Em uma situação, os genes inseridos foram Oct4, Sox2, Lif4, e c-myc, conhecidamente atuantes juntos como reguladores naturais para manter as células em um estado semelhante ao de células-tronco embrionárias. Estas células têm sido descritas na literatura. Veja, por exemplo, Wemig et al., PNAS, 105:5856-5861 (2008); Jaenisch et al., Cell, 132:567-582 (2008); Hanna et al., Cell, 133:250-264 (2008); e Brambrink et al., Cell Stem Cell, 2:151-159 (2008). Estas referências são aqui incorporadas como referências para ensinar IPSCs e métodos para produzi-las. Também é possível que tais células possam ser preparadas por condições de cultura específicas (exposição a agentes específicos).

[0093] O termo “isolada(s)” refere-se a uma célula ou a células que não estã(ão) associada(s) com uma ou mais células ou um ou mais componentes celulares que estão associadas(os) com a célula ou as células in vivo. Uma “população enriquecida” significa um aumento relativo de uma célula desejada em relação a um ou mais outros tipos de célula in vivo ou em cultura primária.

[0094] Contudo, como aqui usado, o termo “isolada(s)” não indica a presença de apenas células-tronco. Ao contrário, o termo “isolada(s)” indica que as células estão removidas de seu ambiente de tecido natural e estão presentes em uma concentração mais alta em comparação com o ambiente de tecido normal. Consequentemente, uma população de células “isolada” pode adicionalmente incluir tipos de célula em adição às células-tronco e pode incluir componentes de tecido adicionais. Isto também pode ser expressado em termos de duplicações celulares, por exemplo. Uma célula pode sofrer 10, 20, 30, 40 ou mais duplicações in vitro ou ex vivo de modo que ela fique enriquecida em comparação com os números originais in vivo ou em seu

ambiente de tecido original (e.g., medula óssea, sangue periférico, tecido adiposo, etc.).

[0095] “MAPC” é um acrônimo para “*multipotent adult progenitor cell*” (célula progenitora adulta multipotente). Neste pedido, o termo é usado para designar um tipo de célula, a saber, uma célula-tronco não-embriônica com características de uma célula-tronco embrionária. Pode produzir linhagens celulares de mais do que uma camada germinativa, tais como duas ou todas as três camadas germinativas (i.e., endoderma, mesoderma e ectoderma) sob diferenciação. MAPCs podem expressar uma ou mais de telomerase, Oct 3/4 (i.e., Oct 3A), rex-1, rox-1 e sox-2, e SSEA-4. O termo “adulta” em MAPC é não-restritivo. Refere-se a uma célula somática não-embriônica. MAPCs são cariotipicamente normais e não formam teratomas *in vivo*. Este acrônimo foi primeiro usado em PCT/US2000/21387 para descrever uma célula pluripotente isolada da medula óssea. Contudo, subsequentemente ao isolamento destas células da medula óssea, outras células com marcadores pluripotenciais e/ou potencial de diferenciação têm sido descobertas e, para os propósitos desta invenção, podem ser funcionalmente equivalentes, com respeito aos efeitos aqui descritos, para aquelas células primeiramente chamadas de “MAPC”.

[0096] O termo “MultiStem®” é a marca comercial de uma célula não-germinativa não-embriônica que é elevadamente expansível, cariomaticamente normal, e não forma teratomas *in vivo*. Pode se diferenciar em linhagens celulares de mais do que uma camada germinativa. As células expressam uma ou mais de telomerase, oct3/4, rex-1, rox-1, sox-2, e SSEA4. MultiStem® é preparada de acordo com os métodos de cultura celular revelados neste pedido de patente, em particular, cultura mais baixa em oxigênio e mais alta em soro.

[0097] “Veículo farmaceuticamente aceitável” é qualquer meio farmaceuticamente aceitável para as células usadas na presente invenção. Um

tal meio pode reter isotonicidade, metabolismo celular, pH, e semelhantes. É compatível com administração a um sujeito *in vivo*, e pode ser usado, portanto, para liberação celular e tratamento.

[0098] O termo “potência” refere-se à capacidade das células (ou do meio condicionada das células) para realizar vários efeitos descritos neste pedido. Consequentemente, potência refere-se ao efeito em vários níveis, incluindo, mas não limitado a (1) reduzir inflamação; (2) reduzir infiltração de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, ou monócitos); (3) reduzir adesão, por exemplo, das selectinas em antígeno Lewis-x sialilado em leucócitos, incluindo, mas não limitados a, linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>; e (4) reduzir a expressão de moléculas de adesão celular sobre células endoteliais, incluindo, mas não limitadas a, ICAM, VCAM, E-selectina, e P-selectina.

[0099] “Células germinativas embrionárias primordiais” (*primordial embryonic germ cells* células PG ou EG) podem ser cultivadas e estimuladas para produzirem muitos tipos de células menos diferenciadas.

[00100] “Células progenitoras” são células produzidas durante diferenciação de uma célula-tronco que têm algumas das, mas não todas as, características de sua progênie terminalmente diferenciada. Células progenitoras definidas, tais como “células progenitoras cardíacas”, estão comprometidas com uma linhagem, mas não com um tipo de célula específico ou terminalmente diferenciado. O termo “progenitora” como usado no acrônimo “MAPC” não limita estas células a uma linhagem específica. Uma célula progenitora pode formar uma célula de progênie que está mais elevadamente diferenciada do que a célula progenitora.

[00101] O termo “reduzir” como aqui usado significa prevenir bem como decrescer. No contexto de tratamento, “reduzir” também é prevenir ou melhorar um ou mais sintomas clínicos. Um sintoma clínico é um (ou mais) que tem ou terá, se deixado não tratado, um impacto negativo sobre a qualidade de vida (saúde) do sujeito. Isto também se aplica aos efeitos

biológicos tais como reduzir extravasão, infra-regular moléculas de adesão sobre células endoteliais, reduzir adesão de leucócitos em células endoteliais, reduzir infiltração de leucócitos para dentro do tecido circundante, reduzir ligação de leucócito, etc., cujo resultado final também se aplica aos efeitos biológicos tais como reduzir extravasão, infra-regular moléculas de adesão sobre células endoteliais, reduzir adesão de leucócitos em células endoteliais, reduzir infiltração de leucócitos para dentro do tecido circundante, reduzir ligação de leucócitos, etc., cujo resultado final seria melhorar os efeitos deletérios de inflamação.

[00102] “Selecionar” uma célula com um nível desejado de potência (e.g., para reduzir expressão de uma ou mais moléculas de adesão) pode significar identificar (como por ensaio), isolar, e expandir uma célula. Isto poderia produzir uma população que tem uma potência mais alta do que a da população de células parentais da qual a célula foi isolada.

[00103] A seleção de uma célula tanto incluiria um ensaio para determinar se há o efeito desejado quanto também incluiria a obtenção daquela célula. A célula pode naturalmente ter o efeito em que a célula não foi incubada com ou exposta a um agente que induz o efeito. A célula pode não ser conhecida em ter o efeito antes de conduzir o ensaio. Visto que os efeitos poderiam depender da expressão e/ou secreção de gene, poder-se-ia também selecionar baseando-se em um ou mais dos genes que causam os efeitos.

[00104] Seleção poderia ser de células de um tecido. Por exemplo, neste caso, células seriam isoladas de um tecido desejado, expandidas em cultura, selecionadas para um efeito desejado, e as células selecionadas seriam adicionalmente expandidas.

[00105] Seleção também poderia ser de células ex vivo, tal como de células em cultura. Neste caso, uma ou mais das células em cultura seria ensaiada para o efeito e as células obtidas que têm o efeito poderiam ser mais

adiante expandidas.

[00106] Células também poderiam ser selecionadas para efeito intensificado. Neste caso, a população de células da qual a célula intensificada é obtida já tem o efeito. A efetividade intensificada significa uma quantidade média mais alta do efeito por célula do que na população parental.

[00107] A população parental da qual a célula intensificada é selecionada pode ser substancialmente homogênea (o mesmo tipo de célula). Uma maneira para obter uma tal célula intensificada desta população é a produção de células individuais ou de combinações de células e ensaiar aquelas células ou combinações de células para o efeito para obter clones que naturalmente têm o efeito (em oposição ao tratamento das células com um modulador do efeito) e então expandir aquelas células que estão naturalmente intensificadas.

[00108] Contudo, células podem ser tratadas com um ou mais agentes que intensificarão o efeito de vias celulares endógenas. Assim, populações substancialmente homogêneas podem ser tratadas para intensificar a modulação.

[00109] Se a população não estiver substancialmente homogênea, então, é preferível que a população de células parentais a ser tratada contenha pelo menos 100 do tipo de célula efetiva no qual o efeito intensificado é almejado, mais preferivelmente pelo menos 1.000 das células, e ainda mais preferivelmente, pelo menos 10.000 das células. Após o tratamento, esta subpopulação pode ser recuperada da população heterogênea por técnicas de seleção de célula conhecidas e mais adiante expandida se desejado.

[00110] Assim, níveis desejados do efeito podem ser aqueles que são maiores do que os níveis em uma determinada população precedente. Por exemplo, células que são postas em cultura primária de um tecido e expandidas e isoladas por condições de cultura que não são especificamente planejadas para ter o efeito, podem fornecer uma população parental. Uma tal

população parental pode ser tratada para intensificar o efeito médio por célula ou selecionada para uma célula ou células dentro da população que expressa nível mais alto. Tais células podem ser expandidas então para fornecer uma população com um efeito (desejado) mais alto.

[00111] “Auto-renovação” refere-se à capacidade para produzir células-tronco descendentes replicadas tendo potencial de diferenciação que é idêntico ao daquelas das quais provêm. Um termo similar usado neste contexto é “proliferação”.

[00112] “Célula-tronco” significa uma célula que pode sofrer auto-renovação (i.e., progênie com o mesmo potencial de diferenciação) e também produzir células de progênie que são mais restritas em potencial de diferenciação. Dentro do contexto da invenção, uma célula-tronco também incluiria uma célula mais diferenciada que tem se desdiferenciado, por exemplo, por transferência nuclear, por fusão com uma célula-tronco mais primitiva, pela introdução de fatores de transcrição específicos, ou pela cultura sob condições específica. Veja, por exemplo, Wilmut et al., Nature, 385:810-813 (1997); Ying et al., Nature, 416:545-548 (2002); Guan et al., Nature, 440:1199-1203 (2006); Takahashi et al., Cell, 126:663-676 (2006); Okita et al., Nature, 448:313-317 (2007); e Takahashi et al., Cell, 131:861-872 (2007).

[00113] Desdiferenciação também pode ser causada pela administração de determinados compostos ou exposição a um ambiente físico in vitro ou in vivo que causaria a desdiferenciação. Células-tronco também podem ser derivadas de tecido anormal, tal como um teratocarcinoma e algumas outras fontes tais como corpos embrióides (embora estas possam ser consideradas células-tronco embrionárias em que elas são derivadas de tecido embrionário, embora não diretamente da massa celular interna). Células-tronco também podem ser produzidas por introdução de genes associados com função de célula-tronco em uma célula-não-tronco, tal como uma célula-tronco

pluripotente induzida.

[00114] “Sujeito” significa um vertebrado, tal como um mamífero, tal como um humano. Mamíferos incluem, mas não são limitados a, humanos, cães, gatos, cavalos, vacas, e porcos.

[00115] O termo “quantidade terapeuticamente efetiva” refere-se a uma quantidade de um agente determinada para produzir qualquer resposta terapêutica em um mamífero. Por exemplo, reagentes terapêuticos antiinflamatórios efetivos podem prolongar a sobrevivência do paciente, e/ou inibir os sintomas clínicos observáveis. Tratamentos que são terapeuticamente efetivos dentro do significado do termo como aqui usado, incluem tratamentos que melhoram uma qualidade de vida do sujeito mesmo se não melhorarem o resultado da doença em si. Tais quantidades terapeuticamente efetivas são prontamente determinadas por uma pessoa ordinariamente experiente na arte. Assim, “tratar” significa liberar uma tal quantidade. Assim, tratar pode ser prevenir ou melhorar quaisquer sintomas patológicos de inflamação.

[00116] “Tratar”, “tratando”, ou “tratamento” são amplamente usados em relação à invenção e cada tal termo inclui, dentre outros, prevenir, melhorar, inibir, ou curar uma deficiência, disfunção, doença, ou outro processo deletério, incluindo aqueles que interferem com e/ou resultam de uma terapia.

### Células-tronco

[00117] A presente invenção pode ser praticada, preferivelmente, usando células-tronco de espécies vertebradas, tais como de humanos, de primatas não-humanos, de animais domésticos, de animais de fazenda, e de outros mamíferos não-humanos. Estas incluem, mas não são limitadas, àquelas células descritas abaixo.

### Células-tronco embrionárias

[00118] A célula-tronco mais bem estudada é a célula-tronco

embrionária (*embryonic stem cell*, ESC) porque tem auto-renovação e potencial de diferenciação multipotente ilimitados. Estas células são derivadas da massa celular interna do blastocisto ou podem ser derivadas das células germinativas primordiais de um embrião de pós-implantação (células germinativas embrionárias, *embryonal germ cells* ou células EG). Células ES e EG têm sido derivadas, primeiro de camundongo, e mais tarde, de muitos animais diferentes, e mais recentemente, também de humanos e de primatas não-humanos. Quando introduzidos em blastocistos de camundongo ou blastocistos de outros animais, ESCs podem contribuir para todos os tecidos do animal. Células ES e EG podem ser identificadas por coloração positiva com anticorpos contra SSEA1 (camundongo) e SSEA4 (humano). Veja, por exemplo, Patentes U.S. de Números 5.453.357; 5.656.479; 5.670.372; 5.843.780; 5.874.301; 5.914.268; 6.110.739 6.190.910; 6.200.806; 6.432.711; 6.436.701. 6.500.668; 6.703.279; 6.875.607; 7.029.913; 7.112.437; 7.145.057; 7.153.684; e 7.294.508, cada uma das quais é incorporada como referência para ensinamento sobre células-tronco embrionárias e métodos de prepará-las e de expandi-las. Consequentemente, ESCs e métodos para isolá-las e expandi-las são bem conhecidos na arte.

[00119] Têm sido identificados numerosos fatores de transcrição e citocinas exógenas que influenciam o estado de potência de células-tronco embrionárias *in vivo*. O primeiro fator de transcrição a ser descrito que está envolvido em pluripotência de célula-tronco é Oct4. Oct4 pertence à família POU (Pit-Oct-Unc) de fatores de transcrição e é uma proteína ligante de DNA que é capaz de ativar a transcrição de genes, contendo uma sequência octamérica chamada de “o motivo octâmero” dentro da região de promotor ou de intensificador. Oct4 é expressado no momento do estágio de clivagem do zigoto fertilizado até que o cilindro de ovo seja formado. A função de Oct3/4 é reprimir os genes induidores de diferenciação (i.e., FoxaD3, hCG) e de ativar os genes promotores de pluripotência (FGF4, Utf1, Rexl). Sox2, um membro

de fatores de transcrição de box de grupo de mobilidade alta (*high mobility group*, HMG), coopera com Oct4 para ativar transcrição de genes expressados na massa celular interna. É essencial que a expressão de Oct3/4 em células-tronco embrionárias seja mantida entre determinados níveis. Sobre-expressão ou infra-regulação de >50% de nível de expressão de Oct4 alterará o destino de célula-tronco embrionária, com a formação de endoderma / mesoderma ou trofectoderma primitivo, respectivamente. In vivo, embriões deficientes em Oct4 desenvolvem-se para o estado de blastocisto, mas as células de massa interna não são pluripotentes. Em vez disso de diferenciam ao longo da linhagem de trofoblasto extraembrionário. Sall4, um fator de transcrição Spalt de mamífero, é um regulador a montante de Oct4, e é portanto importante para manter níveis apropriados de Oct4 durante as fases iniciais de embriologia. Quando níveis de Sall4 caem para abaixo de um determinado limite, células trofectodermais se expandirão ectopicamente para dentro da massa celular interna. Outro fator de transcrição exigido para pluripotência é Nanog, chamado segundo a tribo céltica “Tir Nan Og”: a terra do sempre jovem. In vivo, Nanog é expressado do estágio da mórula compactada, é subsequentemente definido para a massa celular interna e é infra-regulado pelo estágio de implantação. Infra-regulação de Nanog pode ser importante para evitar uma expansão descontrolada de células pluripotentes e para permitir diferenciação de multilinhagens durante gastrulação. Embriões nulos em Nanog, isolados no dia 5,5, consistem de um blastocisto desorganizado, contendo principalmente endoderma extraembrionário e nenhum epiblasto discernível.

### Células-tronco-não-embryonárias

[00120] Células-tronco têm sido identificadas na maioria dos tecidos. Talvez a melhor caracterizada seja a célula-tronco hematopoiética (*hematopoietic stem cell*, HSC). HSCs são células derivadas de mesoderma que podem ser purificadas usando marcadores de superfície de célula e

características funcionais. Têm sido isoladas de medula óssea, sangue periférico, sangue do cordão, fígado fetal, e saco embrionário. Iniciam hematopoiese e geram múltiplas linhagens hematopoiéticas. Quando transplantadas para dentro de animais letalmente irradiados, podem repovoar a combinação de células neutrófilo-macrófago eritróides, megacariócito, e hematopoiéticas linfóides. Também podem ser induzidas para sofrerem divisão celular auto-renovável. Veja, por exemplo, Patentes U.S. de Números 5.635.387; 5.460.964; 5.677.136; 5.750.397; 5.681.599; e 5.716.827. Patente U.S. de Número 5.192.553 relata métodos para isolar células progenitoras ou células-tronco hematopoiéticas fetais ou neonatais de humano. Patente U.S. de Número 5.716.827 relata células hematopoiéticas de humano que são progenitoras Thy-1<sup>+</sup>, e meios de crescimento apropriados para regenerá-las in vitro. Patente U.S. de Número 5.635387 relata um método e um dispositivo para cultivar células hematopoiéticas de humano e seus precursores. Patente U.S. de Número 6.015,554 descreve um método de reconstituir células dendríticas e linfóides de humano. Consequentemente, HSCs e métodos para isolá-las e expandi-las são bem conhecidos na arte.

[00121] Outra célula-tronco que é bem conhecida na arte é a célula-tronco neural (*neural stem cell*, NSC). Estas células podem se proliferar in vivo e continuamente regenerar pelo menos algumas células neuronais. Quando cultivadas ex vivo, células-tronco neurais podem ser induzidas para se proliferarem bem como se diferenciarem em tipos diferentes de neurônios e células gliais. Quando transplantadas para dentro do cérebro, as células-tronco neurais podem se enxertar e gerar células gliais e neurais. Veja, por exemplo, Gage F.H., Science, 287:1433-1438 (2000), Svendsen S.N. et al, Brain Pathology, 9:499-513 (1999), e Okabe S. et al., Mech Development, 59:89-102 (1996). Patente U.S. de Número 5.851.832 relata células-tronco neurais multipotentes obtidas de tecido cerebral. Patente U.S. de Número 5.766.948 relata produção de neuroblastos de hemisférios cerebrais de recém-nascidos.

Patentes U.S. de Números 5.564.183 e 5.849.553 relatam o uso de células-tronco de crista neural de mamífero. Patente U.S. de Número 6.040.180 relata geração *in vitro* de neurônios diferenciados de culturas de células-tronco multipotenciais do SNC de mamífero. WO 98/50526 e WO 99/01159 relatam geração e isolamento de células-tronco neuroepiteliais, precursores de oligodentrócito-astrócito, e precursores neuronais restritos à linhagem. Patente U.S. de Número 5.968.829 relata células-tronco neurais obtidas de prosencéfalo embrionário.

[00122] Outra célula-tronco tem sido estudada extensivamente na arte é a célula-tronco mesenquimal (*mesenchymal stem cell*, MSC). MSCs são derivadas do mesoderma embrionário e podem ser isoladas de muitas fontes, incluindo medula óssea de adulto, sangue periférico, tecido adiposo, placenta, e sangue umbilical, dentre outras. MSCs podem se diferenciar em muitos tecidos mesodermais, incluindo músculo, osso, cartilagem tecido adiposo, e tendão. Há literatura considerável sobre estas células. Veja, por exemplo, Patentes U.S. de Números 5.486.389; 5.827.735; 5.811.094; 5.736.396; 5.837.539; 5.837.670; e 5.827.740. Veja também Pittenger, M. et al, *Science*, 284:143-147 (1999).

[00123] Outro exemplo de uma célula-tronco de adulto é o de células-tronco de adulto derivadas de adipose (*adipose-derived adult stem cells*, ADSCs) que têm sido isoladas de tecido adiposo, tipicamente por lipossucção seguida por liberação das ADSCs usando colagenase. ADSCs são similares em muitos aspectos às MSCs derivadas de medula óssea, exceto que é possível isolar muito mais células de tecido adiposo. Tem sido relatado que estas células se diferenciam em osso, tecido adiposo, músculo, cartilagem, e neurônios. Um método de isolamento tem sido descrito em U.S. 2005/0153442.

[00124] Outras células-tronco que são conhecidas na arte incluem células-tronco gastrointestinais, células-tronco epidermais, e células-tronco

hepáticas, que também têm sido chamadas de “células ovais” (Potten, C., et al., Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 353:821-830 (1998), Watt, F., Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 353:831 (1997); Alison et al., Hepatology, 29:678-683 (1998).

[00125] Outras células não-embriónárias que são relatadas como capazes de se diferenciarem em tipos de célula de mais do que uma camada germinativa embrionária incluem, mas não são limitadas a, células do sangue de cordão umbilical (veja Publicação U.S. de Número 2002/0164794), placenta (veja Publicação U.S. de Número 2003/0181269, matriz de cordão umbilical (Mitchell, K.E. et al., Stem Cells, 21:50-60 (2003)), células-tronco semelhantes a embrionárias (Kucia, M. et al., J Physiol Pharmacol, 57 Suppl 5:5-18 (2006)), células-tronco de fluido amniótico (Atala, A., J. Tissue Regen. Med., 1:83-96 (2007)), precursores derivados de pele (Toma et al., Nat. Cell Biol., 3:778-784 (2001)), e medula óssea (veja Publicações U.S. de Números 2003/0059414 e 2006/0147246), cada uma das quais é incorporada como referência para ensinamento destas células.

#### Estratégias de reprogramação de células somáticas

[00126] Várias estratégias diferentes tais como transplantação nuclear, fusão celular, e reprogramação induzida por cultura têm sido utilizadas para induzir a conversão de células diferenciadas em um estado embrionário. Transferência nuclear envolve a injeção de um núcleo somático para dentro de um oócito enucleado, que, sob transferência para dentro de uma mãe de aluguel, pode produzir um clone (“clonagem reprodutiva”), ou, sob explantação em cultura, pode produzir células-tronco embrionárias (ES) geneticamente igualadas (“*somatic cell nuclear transfer*”, SCNT, transferência nuclear de célula somática). A fusão celular de células somáticas com células ES resulta na geração de híbridos que mostram todas as características de células ES pluripotentes. Explantação de células somáticas em cultura seleciona linhagens de células imortais que podem ser

pluripotentes ou multipotentes. No presente, células-tronco espermatogônicas são a única fonte de células pluripotentes que podem ser derivadas de animais pós-natais. Transdução de células somáticas com fatores definidos pode iniciar reprogramação para um estado pluripotente. Estas abordagens experimentais têm sido extensivamente revistas (Hochedlinger e Jaenisch, *Nature*, 441:1061 -1067 (2006) e Yamanaka, S., *Cell Stem Cell*, 1:39-49 (2007)).

### Transferência nuclear

[00127] Transplantação nucelar (*nuclear transplantation*, NT), também chamada de transferência nuclear de célula somática (*somatic cell nuclear transfer*, SCNT), denota a introdução de um núcleo de uma célula somática doadora para dentro de um oócito enucleado para gerar um animal clonado tal como a ovelha Dolly (Wilmut et al., *Nature*, 385:810-813 (1997). A geração de animais vivos por NT demonstrou que o estado epigenético de células somáticas, incluindo aquele de células terminalmente diferenciadas, embora estável, não está irreversivelmente fixado mas pode ser reprogramado para um estado embrionário que é capaz de dirigir o desenvolvimento de um organismo novo. Em adição ao fornecimento de uma abordagem experimental excitante para elucidar os mecanismos epigenéticos básicos envolvidos em desenvolvimento e doença embrionário(a), tecnologia de clonagem nuclear é potencialmente interessante para medicina de transplantação paciente-específica

### Fusão de células somáticas e células-tronco embrionárias

[00128] Reprogramação epigenética de núcleos somáticos em um estado não-diferenciado tem sido demonstrada em híbridos murinos produzidos por fusão de células embrionárias com células somáticas. Híbridos entre várias células somáticas e células de carcinoma embrionárias (Solter, D., *Nat Rev Genet*, 7:319-327 (2006), células germinativas embrionárias (EG), ou células ES (Zwaka e Thomson, *Development*, 132:227-233 (2005))

compartilham muitas características com as das células embrionárias parenterais, indicando que o fenótipo pluripotente é dominante em tais produtos de fusão. Como com camundongo (Tada et al., Curr Biol, 11:1553-1558 (2001)), células ES de humano têm o potencial de reprogramarem os núcleos somáticos após fusão (Cowan et al., Science, 309:1369-1373(2005)); Yu et al., Science, 318:1917-1920 (2006)). Ativação de marcadores de pluripotência silenciosos tal como Oct4 ou reativação de cromossomo X somático inativo forneceram evidência molecular para reprogramação do genoma somático nas células híbridas. Tem sido sugerido que a replicação de DNA é essencial para a ativação de marcadores de pluripotência, que é primeiro observado 2 dias após a fusão (Do e Scholer, Stem Cells, 22:941-949 (2004)), e que sobre-expressão forçada de Nanog em células ES promove pluripotência quando fusionadas com células-tronco neurais (Silva et al., Nature, 441:997-1001 (2006)).

#### Reprogramação induzida por cultura

[00129] Células pluripotentes têm sido derivadas de fontes embrionárias tais como blastômeros e a massa celular interna (*inner cell mass*, ICM) do blastocisto (células ES), o epiblasto (células EpiSC), células germinativas primordiais (*primordial germ cells*, células EG), e células-tronco espermatogônicas pós-natais (*postnatal spermatogonial stem cells*, células “maGSCsm” “ES-like”). As seguintes células pluripotentes, juntamente com sua(seu) célula/tecido doador(a) são: células ES partogenéticas são derivadas de óócitos murinos (Narasimha et al., Curr Biol, 7:881-884 (1997)); células-tronco embrionárias têm sido derivadas de blastômeros (Wakayama et al., Stem Cells, 25:986-993 (2007)); células de massa celular interna (fonte não aplicável) (Eggan et al., Nature, 428:44-49 (2004)); células germinativas embrionárias e células de carcinoma embrionárias têm sido derivadas de células germinativas primordiais (Matsui et al., Cell, 70:841-847 (1992)); GMCS, maSSC, e MASC têm sido derivadas de células-tronco

espermatozoides (Guan et al., Nature, 440:1199-1203 (2006); Kanatsu-Shinohara et al., Cell, 119:1001-1012 (2004); e Seandel et al., Nature, 449:346-350 (2007)); células EpiSC são derivadas de epiplastos (Brons et al., Nature, 448:191-195 (2007); Tesar et al., Nature, 448:196-199(2007)); células ES partogenéticas têm sido derivadas de oócitos de humano (Cibelli et al., Science, 295L819 (2002); Revazova et al., Cloning Stem Cells, 9:432-449 (2007)); células ES de humano têm sido derivadas de blastocistos de humano (Thomson et al., Science, 282:1145-1147 (1998)); MAPC têm sido derivadas de medula óssea (Jiang et al., Nature, 418:41-49 (2002); Phinney e Prockop, Stem Cells, 25:2896-2902 (2007)); células de sangue de cordão (derivadas de sangue de cordão)m (van de Ven et al., Exp Hematol, 35:1753-1765 (2007)); células derivadas de neurosfera derivadas de célula neural (Clarke et al., Science, 288:1660-1663 (2000)). Células doadoras da linhagem germinativa tais como PGCs ou células-tronco espermatozoides são conhecidamente unipotentes *in vivo*, mas tem sido mostrado que são células ES-like pluripotentes (Kanatsu- Shinohara et al., Cell, 119:1001-1012 (2004) ou maGSCs (Guan et al., Nature, 440:1199-1203 (2006), podem ser isoladas após cultura prolongada *in vitro*. Embora a maioria destes tipos de células pluripotentes fosse capaz de diferenciação e formação de teratoma *in vitro*, apenas ES, EG, EC, e células RS-like ou maGCSs derivadas de célula-tronco espermatozoidal foram pluripotentes por critérios mais estritamente, porque foram capazes de formarem quimeras pós-natais e contribuírem para a linhagem germinativa. Recentemente, células-tronco espermatozoides de adulto multipotentes, (*multipotent adult spermatogonial stem cells*, MASCs) foram derivadas de células-tronco espermatozoides testiculares de camundongos adultos, e estas células tiveram um perfil de expressão diferente daquele de células ES cells (Seandel et al., Nature, 449:346-350 (2007)) mas similar ao de células EpiSC, que foram derivadas do epiblasto de embriões de camundongo de pós-implantação (Brons et al., Nature, 448:191-195 (2007);

Tesaret al., Nature, 448:196-199 (2007)).

#### Reprogramação por fatores de transcrição definidos

[00130] Takahashi e Yamanaka têm relatado a reprogramação de células somáticas de volta para o estado ES-like (Takahashi e Yamanaka, Cell, 126:663-676 (2006)). Eles reprogramaram com sucesso fibroblastos embrionários de camundongo (*mouse embryonic fibroblasts*, MEFs) e fibroblastos de adulto em células ES-like pluripotentes após transdução mediada por vírus dos quatro fatores de transcrição Oct4, Sox2, c-myc, e Klf4 seguida por seleção para ativação do gene Fbx15 selecionador de Oct4 (Figure 2A). Células que haviam ativado Fbx15 foram chamadas de células iPS (*induced pluripotent stem*, células tronco pluripotentes induzidas) e foi mostrado que são pluripotentes por causa de sua capacidade para formarem teratomas, embora fossem incapazes de gerar quimeras vivas. Este estado pluripotente foi dependente da expressão viral contínua dos genes Oct4 e Sox2 transduzidos, enquanto que os genes endógenos Oct4 e Nanog quer não expressaram quer expressaram em um nível mais baixo do que em células ES, e foi verificado que seus respectivos promotores estão muito metilados. Isto está consistente com a conclusão de que as células Fbx15-iPS não correspondem às células ES mas podem ter representado um estado incompleto de reprogramação. Embora experimentos genéticos tenham estabelecido que Oct4 e Sox2 são essenciais para pluripotência (Chambers e Smith, Oncogene, 23:7150-7160 (2004); Ivanona et al., Nature, 442:5330538 (2006); Masui et al., Nat Cell Biol, 9:625-635 (2007)), o papel dos dois oncogenes-myc and Klf4 em reprogramação está menos claro. Alguns destes oncogenes podem, de fato, ser dispensáveis para reprogramação, porque ambas as células iPS de camundongo e de humano têm sido obtidas na ausência de transdução de c-myc, embora com eficiência baixa (Nakagawa et al., Nat Biotechnol, 26:191-106 (2008); Weming et al., Nature, 448:318-324 (2008); Yu et al., Science, 318: 1917-1920 (2007)).

## MAPC

[00131] MAPC é um acrônimo para “*multipotent adult progenitor cell* (célula progenitora adultas multipotentes” (não-ES, não-EG, não-germinativas). MAPC tem a capacidade para se diferenciar em tipos de célula de pelo menos duas, tais como, todas as três, camadas germinativas primitivas (ectoderma, mesoderma, e endoderma). Genes encontrados em células ES também podem ser encontrados em MAPC (e.g., telomerase, Oct 3/4, rex-1, rox-1, sox-2). Oct 3/4 (Oct 3A em humanos) parece ser específico para células ES e germinativas. MAPC representa uma população de células progenitoras mais primitivas do que MSC (Verfaillie, C.M., Trends Cell Biol 12:502-8 (2002), Jahagirdar, B.N., et al., Exp Hematol, 29:543-56 (2001); Reyes, M. e C.M. Verfaillie, Ann N Y Acad Sci, 938:231-233 (2001); Jiang, Y. et al., Exp Hematol, 30:896-904 (2002); e (Jiang, Y. et al., Nature, 418:41-9. (2002)).

[00132] MAPCs de humano estão descritas em Patente U.S. de Número 7.015.037 e Pedido U.S. de Número 10/467.963. MAPCs têm sido identificadas em outros mamíferos. MAPCs murinas, por exemplo, também são descritas em Patente U.S. de Número 7.015.037 e Pedido U.S. de Número 10/467.963. MAPCs de rato também são descritas em Pedido U.S. de Número 10/467.963.

[00133] Estas referências são incorporadas como referências para descrever MAPCs primeiro isoladas por Catherine Verfaillie.

## Isolamento e crescimento de MAPCs

[00134] Métodos de isolamento de MAPC são conhecidos na arte. Veja, por exemplo, Patente U.S. de Número 7.015.037 e Pedido U.S. de Número 10/467.963, e estes métodos, juntamente com a caracterização (fenótipo) de MAPCs, são incorporados aqui como. MAPCs podem ser isoladas de múltiplas fontes, incluindo, mas não limitadas a, medula óssea, placenta, sangue de cordão umbilical e sangue de cordão, músculo, cérebro,

fígado, medula espinhal, sangue ou pele. Portanto, é possível se obterem aspirados de medula óssea, biopsias de cérebro ou de fígado, e de outros órgãos, e isolar as células usando técnicas de seleção positivas ou negativas disponíveis para aquelas pessoas experientes na arte, baseando-se nos genes que são expressados (ou não expressados) nestas células (e.g., por ensaios funcionais ou morfológicos tais como aqueles revelados nos pedidos acima referidos, que têm sido aqui incorporados como referências).

MAPCs de medula óssea de humano como descrito em Patente U.S. de Número 7.015.037

[00135] MAPCs não expressam o antígeno de leucócito comum CD45 ou a glicoproteína-A (Gly-A) específica para eritroblasto. A população mista de células foi submetida a uma separação em Ficoll Hypaque. As células foram então submetidas à seleção negativa usando anticorpos anti-CD45 e anti-Gly-A, depleção da população de células CD45<sup>+</sup> e Gly-A<sup>+</sup>, e o restante de aproximadamente 0,1% de células mononucleares de medula foi então recuperado. As células também não puderam ser plaqueadas em cavidades revestidas com fibronectina e cultivadas como descrito abaixo por 2-4 semanas para depletar as células de células CD45<sup>+</sup> e Gly-A<sup>+</sup>. Em culturas de células de medula óssea aderentes, muitas células estromais aderentes sofreram senescência replicativa ao redor de 30 duplicações celulares e uma população mais homogênea de células continua a se expandir e mantém telômeros longos.

[00136] Alternativamente, seleção positiva pode ser usada para isolar as células via uma combinação de marcadores célula-específicos. Ambas as técnicas de seleção positiva e negativa estão disponíveis para aquelas pessoas experientes na arte, e numerosos anticorpos monoclonais e policlonais adequados para propósitos de seleção negativa também estão disponíveis na arte (veja, por exemplo, Leukocyte Typing V, Schlossman, et al., Eds. (1995) Oxford University Press) e estão comercialmente disponíveis em numerosas

fontes.

[00137] Técnicas para separação de células de mamífero de uma mistura de populações de células também têm sido descritas por Schwartz, et al., em Patente U.S. de Número 5.759.793 (separação magnética), Basch et al., 1983 (cromatografia de imunoafinidade), e Wysocki e Sato, 1978 (fracionamento celular ativado por fluorescência).

#### Cultura de MAPCs como descrita em U.S. 7.015.037

[00138] MAPCs isoladas como aqui descrito podem ser cultivadas usando métodos aqui revelados e em Patente U.S. de Número 7.015.037, que é aqui incorporada como referência para estes métodos.

[00139] Células podem ser cultivadas em meio de cultura livre de soro ou baixo em soro. Meio livre de soro usado para cultivar MAPCs é descrito em Patente U.S. de Número 7.015.037. Muitas células têm sido crescidas em meio livre de soro ou baixo em soro. Neste caso, o meio é suplementado com um ou mais fatores de crescimento. Fatores de crescimento comumente usados incluem mas não são limitados a proteína morfogênica de osso, fator de crescimento de fibroblasto básico, fator de crescimento derivado de plaqueta, e fator de crescimento epidermal. Veja, por exemplo, Patentes U.S. de Números 7.169.610; 7.109.032; 7.037.721; 6.617.161; 6.617.159; 6.372.210; 6.224.860; 6.037.174; 5.908.782; 5.766.951; 5.397.706; e 4.657.866; todas incorporadas como referências para ensinamento de crescimento de células em meio livre de soro.

#### Métodos de cultura adicionais

[00140] Em experimentos adicionais a densidade na qual as MAPCs são cultivadas pode variar de cerca de 100 células/cm<sup>2</sup> ou cerca de 150 células/cm<sup>2</sup> a cerca de 10.000 células/cm<sup>2</sup>, incluindo cerca de 200 células/cm<sup>2</sup> a cerca de 1.500 células/cm<sup>2</sup> a cerca de 2.000 células/cm<sup>2</sup>. A densidade pode variar entre as espécies. Adicionalmente, densidade ótima pode variar dependendo das condições da cultura e da fonte das célula. Está dentro da

capacidade do técnico comum determinar a densidade ótima para um determinado conjunto de células e condições de cultura.

[00141] Também, concentrações de oxigênio atmosférico efetivas de menores do que cerca de 10%, incluindo cerca de 1-5% e, especialmente, 3-5%, podem ser usadas em qualquer momento durante o isolamento, o crescimento e a diferenciação de MAPCs em cultura.

[00142] Células podem ser cultivadas sob várias concentrações de soro, e.g., cerca de 2-20%. Soro fetal bovino pode ser usado. Soro mais alto pode ser usado em combinação com tensões de oxigênio mais baixas, por exemplo, cerca de 15-20%. Células não precisam ser selecionadas antes da aderência em placas de cultura. Por exemplo, após um gradiente em Ficoll, as células podem de diretamente plaqueadas, e.g., 250.000-500.000/cm<sup>2</sup>. Colônias aderentes podem ser selecionadas, possivelmente combinadas, e expandidas.

[00143] Em uma modalidade, usada nos procedimentos experimentais nos Exemplos, condições de soro alto (cerca de 15-20%) e oxigênio baixo (ao redor de 3-5%) foram usadas para a cultura de células. Especificamente, células aderentes de colônias foram plaqueadas e passadas em densidades de cerca de 1.700-2.300 células/cm<sup>2</sup> em soro 18% e oxigênio 3% (com PDGF e EGF).

[00144] Em uma modalidade específica para MAPCs, suplementos são componentes ou fatores celulares que permitem que MAPCs retenham a capacidade para se diferenciarem em todas as três linhagens. Isto pode ser indicado pela expressão dos marcadores específicos do estado não-diferenciado. MAPCs, por exemplo, constitutivamente expressam Oct 3/4 (Oct 3A) e mantêm níveis altos de telomerase.

### Cultura celular

[00145] Para todos os componentes listados abaixo, veja U.S. 7.015.037, que é incorporada como referência para ensinamento destes componentes.

[00146] Em geral, células úteis para a invenção podem ser mantidas e expandidas em meio de cultura que está disponível e é bem conhecido na arte. Também está contemplada a suplementação de meio de cultura celular com soros de mamífero. Suplementos adicionais também podem ser usados vantajosamente para alimentar as células com os elementos traço necessários para crescimento e expansão ótimos. Hormônios também podem ser vantajosamente usados em cultura celular. Lipídeos e veículos lipídicos também podem ser usados para suplementar os meios de cultura celular, dependendo do tipo de célula e do destino da célula diferenciada. Também está contemplada a utilização de camadas celulares alimentadoras.

[00147] Células também podem ser crescidas em culturas “3D” (agregadas). Um exemplo é PCT/US2009/31528, depositado aos 21 de Janeiro de 2009.

[00148] Uma vez estabelecidas em cultura, as células podem ser usadas novas ou congeladas e armazenadas como estoques congelados, usando, por exemplo, DMEM com 40% de FCS e 10% de DMSO. Outros métodos para preparar estoques congelados para células congeladas também estão disponíveis para aquelas pessoas experientes na arte.

#### Formulações farmacêuticas

[00149] U.S. 7.015.037 é incorporada como referência para ensinamento de formulações farmacêuticas. Em determinadas modalidades, as populações de células estão presentes dentro de uma composição adaptada para e adequada para liberação, i.e., fisiologicamente compatível.

[00150] Em algumas modalidades a pureza das células (ou do meio condicionado) para administração a um sujeito é cerca de 100% (substancialmente homogêneo). Em outras modalidades é 95% a 100%. Em algumas modalidades é 85% a 95%. Particularmente, no caso de misturas com outras células, a percentagem pode ser cerca de 10%-15%, 15%-20%, 20%-25%, 25%-30%, 30%-35%, 35%-40%, 40%-45%, 45%-50%, 60%-70%,

70%-80%, 80%-90%, ou 90%-95%. Ou isolamento / pureza pode ser expressado(a) em termos de duplicações celulares onde as células têm sofrido, por exemplo, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50 ou mais duplicações celulares.

[00151] A escolha de formulação para administração das células para uma determinada aplicação dependerá de uma variedade de fatores. Proeminente dentre estes será a espécie de sujeito, a natureza da condição sendo tratada, seu estado e sua distribuição no sujeito, a natureza das outras terapias e de outros agentes que estão sendo administradas(os), a rota ótima de administração, capacidade de sobrevivência via a rota, o regime de dosagem, e outros fatores que serão evidentes para aquelas pessoas experientes na arte. Por exemplo, a escolha de veículos e outros aditivos adequados dependerá da rota exata de administração e da natureza da forma de dosagem específica.

[00152] Formulações finais da suspensão aquosa de células / meio tipicamente envolverão ajuste da força iônica da suspensão para isotonicidade (i.e., cerca de 0,1 a 0,2) e para pH fisiológico pH (i.e., cerca de pH 6,8 a 7,5). A formulação final também tipicamente conterá um lubrificante fluido.

[00153] Em algumas modalidades, células / meio são formulados em uma forma injetável de dosagem unitária, tal como uma solução, suspensão, ou emulsão. Formulações farmacêuticas para injeção de células / meio tipicamente são dispersões e soluções aquosas estéreis. Veículos para formulações injetáveis podem ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, solução salina, solução salina tamponada com fosfato, poliol (por exemplo, glicerol, propileno-glicol, poli(etileno-glicol) líquido, e semelhantes), e suas misturas adequadas.

[00154] O técnico experiente pode prontamente determinar a quantidade de células e os aditivos, veículos, e/ou agente de transporte ótimos em composições a serem administradas em métodos da invenção. Tipicamente, quaisquer aditivos (em adição às células) estão presentes em

uma quantidade de 0,001 a 50% em peso em solução, tal como em solução salina tamponada com fosfato. O ingrediente está presente na ordem de microgramas a miligramas, tal como cerca de 0,0001 a cerca de 5% em peso, preferivelmente cerca de 0,0001 a cerca de 1% em peso, muito mais preferivelmente cerca de 0,0001 a cerca de 0,05% em peso ou cerca de 0,001 a cerca de 20% em peso, preferivelmente cerca de 0,01 a cerca de 10% em peso, e muito mais preferivelmente cerca de 0,05 a cerca de 5% em peso.

[00155] A dosagem das células variará dentro de limites amplos e será ajustada para as exigências individuais em cada caso específico. Em geral, no caso de administração parenteral, é habitual administrar de cerca de 0,01 a cerca de 20 milhões de células / kg de peso corporal do paciente recipiente. O número de células variará dependendo do peso e da condição do paciente recipiente, do número ou da frequência de administrações, e de outras variáveis conhecidas por aquelas pessoas experientes na arte. As células podem ser administradas por uma rota que é adequada para o tecido ou órgão. Por exemplo, podem ser administradas sistemicamente, i.e., parenteralmente, por administração intravenosa, ou podem ser direcionadas para um tecido ou órgão específico. podem ser administradas via administração subcutânea ou por administração para dentro de tecidos desejados específicos.

[00156] As células podem ser suspensas em um excipiente apropriado em uma concentração de cerca de 0,01 a cerca de  $5 \times 10^6$  células/ml. Excipientes adequados para soluções de injeção são aqueles que são biologicamente e fisiologicamente compatíveis com as células e com o paciente recipiente, tal como solução salina tamponada ou outros excipientes adequados. A composição para administração pode ser formulada, produzida, e armazenada de acordo com métodos padrão sujeitos às estabilidade e esterilidade apropriadas.

#### Administração para dentro de tecidos linfo-hematopoiéticos

[00157] Técnicas para administração para dentro destes tecidos são

conhecidas na arte, Por exemplo, injeções intra-medula óssea podem envolver injeção de células diretamente para dentro da cavidade da medula óssea tipicamente da crista ilíaca posterior mas pode incluir outros sítios na crista ilíaca, no fêmur, na tíbia, no úmero, ou na ulna; injeções esplênicas poderiam envolver injeções radiograficamente guiadas para dentro do baço ou exposição cirúrgica do baço via laparoscopia ou laparotomia; remendos de Peyer, injeções de GALT, ou BALT poderiam exigir procedimentos de injeção por laparotomia ou laparoscopia.

### Dosagem

[00158] Doses para humanos ou outros mamíferos podem ser determinadas sem experimentação indevida pelo técnico experiente, a partir desta revelação, dos documentos citados, e do conhecimento na arte. A dose de células / meio apropriada para ser usada de acordo com várias modalidades da invenção dependerá de numerosos fatores. Os parâmetros que determinarão as doses ótimas a serem administradas para terapia primária ou adjuntiva geralmente incluirão alguns ou todos os seguintes: a doença sendo tratada e seu estágio; a espécie do sujeito, sua saúde, seu sexo, sua idade, seu peso, e sua taxa metabólica; a imunocompetência do sujeito; outras terapias sendo administradas; e complicações potenciais esperadas da história ou do genótipo do sujeito. Os parâmetros também podem incluir: se as células são singênicas, autólogas, aligênicas, ou xenogênicas; sua potência (atividade específica); o sítio e/ou a distribuição que precisa ser selecionado para as células / meio serem efetivas; e tais características do sítio tais como acessibilidade para as células / meio e/ou o enxerto de células. Parâmetros adicionais incluem coadministração com outros fatores (tais como citocinas e fatores de crescimento). A dose ótima em uma determinada situação também levará em consideração à maneira na qual as células / meio são formuladas, a maneira na qual são administrados, e o grau no qual as células / meio estarão localizadas nos sítios alvo após a administração.

[00159] A dose ótima de células poderia estar dentro da faixa de doses para transplantação de medula óssea mononuclear, autóloga. Para preparações de células razoavelmente puras, doses ótimas em várias modalidades variarão de  $10^4$  a  $10^8$  células/kg de massa de paciente recipiente por administração. Em algumas modalidades a dose ótima por administração estará entre  $10^5$  e  $10^7$  células/kg. Em muitas modalidades a dose ótima por administração será  $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$  células/kg. Por meio de referência, doses mais altas nas supracitadas são análogas às doses de células nucleadas usadas em transplantação de medula óssea mononuclear autóloga. Algumas das doses mais baixas são análogas ao número de células CD34<sup>+</sup>/kg usado em transplantação de medula óssea mononuclear autóloga.

[00160] Em várias modalidades, as células / meio podem ser administradas em uma dose inicial, e depois mantidas por administração adicional. Células / meio podem ser administradas por um método inicialmente, e depois administradas pelo mesmo método ou um ou mais métodos diferentes. Os níveis podem ser mantidos pela administração contínua das células / meio. Várias modalidades administram as células / meio quer inicialmente quer para manter seu nível no sujeito ou ambos por injeção intravenosa. Em uma variedade de modalidades, outras formas de administração, são usadas, dependendo da condição do paciente e de outros fatores, discutidos aqui alhures.

[00161] Células / meio podem ser administradas em muitas frequências durante uma ampla faixa de tempos. Geralmente as durações de tratamento serão proporcionais à duração do processo doentio, à efetividade das terapias sendo aplicadas, e à condição e à resposta do sujeito sendo tratado.

### Usos

[00162] Devido ao fato de as células da invenção secretarem um ou mais fatores que finalmente reduzem a inflamação por meio de vários mecanismos biológicos descritos neste medido, a administração das células é

útil para reduzir inflamação indesejável em qualquer número de patologias, como listadas acima.

[00163] Em adição, outros usos são fornecidos pelo conhecimento dos mecanismos biológicos descritos neste pedido. Um destes inclui descoberta de droga. Este aspecto envolve seleção de um ou mais compostos para a capacidade de modular os efeitos antiinflamatórios das células. Isto envolveria, primeiro, desenvolver um ensaio para a capacidade da célula em reduzir qualquer uma das seguintes: (1) inflamação, (2) extravasão, (3) ligação de leucócito em célula endotelial, (4) expressão de moléculas de adesão em células endotelial (RNA e/ou proteína), (5) expressão do ligante cognato (localizado sobre um leucócito) que se liga na molécula de adesão celular, se expressão deste ligante for modulada pela célula endotelial, e (6) produção de citocinas por células endoteliais. Consequentemente, o ensaio pode ser planejado para ser conduzido *in vivo* ou *in vitro*. Ensaios de modulação poderiam avaliar o estado de ativação em qualquer nível desejado, e.g., morfológico, expressão de gene, funcional, etc. Pode envolver endotélio vascular isolado. Alternativamente, pode envolver células endoteliais vasculares parcial ou totalmente removidas do endotélio, incluindo cepas de células endoteliais e linhagens de células endoteliais, ambas naturais e recombinantes. Contudo, também pode incluir componentes celulares isolados conhecidos por terem afinidade de ligação tais como moléculas de adesão que são expressadas sobre as células endoteliais e seus ligantes de ligação cognatos que são encontrados sobre leucócitos. Assim, as células recombinantes expressando ou secretando a molécula de adesão celular e o ligante de leucócito cognato poderiam ser usados para ensaio de ligação. Ou o parceiro de ligação de linfócito isolado poderia ser usado com a célula expressando a molécula de adesão endotelial, tal como P-selectina ou E-selectina e CD15s; ICAM-1 ou ICAM-2 e LFA-1; ICAM e Mac-1; VCAM-1 e VLA-4.

[00164] O ensaio pode conter uma citocina ativadora, tal como TNF- $\alpha$ , ou IL-1 $\beta$ . A citocina sozinha pode formar a base para o ensaio. Por exemplo, as células / meio poderiam ser ensaiadas para a capacidade para ligar TNF- $\alpha$  ou atuar como inibidor competitivo de receptor de TNF- $\alpha$  em um ensaio de receptor baseado em célula ou com receptor solúvel. TNF- $\alpha$  não ligado poderia ser detectado diretamente ou o ensaio para TNF- $\alpha$  não ligado poderia ser um ensaio para qualquer um dos efeitos biológicos de TNF- $\alpha$ . Isto também se aplica a qualquer uma das outras citocinas ativadoras, e.g., IL-1.

[00165] Ou o ensaio poderia envolver a capacidade da célula / meio para modular (aumentar,, decrescer) NF $\kappa$ B em um ensaio baseado em receptor com um gene repórter operacionalmente ligado em um promotor controlado por NF $\kappa$ B. O ensaio poderia então ser usado para selecionar compostos / agentes que aumentam ou decrescem o efeito as células / meio.

[00166] Expressão de gene pode ser avaliada por ensaio direto de proteína ou RNA. Isto pode ser feito por intermédio das técnicas bem conhecidas na arte, tais como por FACS e outros métodos de detecção baseados em anticorpo e PCR e outros métodos de detecção baseados em hibridização. Ensaios indiretos também podem ser usados para expressão, tal como ligação em qualquer um dos parceiros de ligação conhecidos.

[00167] Ensaios para expressão / secreção incluem, mas não são limitados a, ELISA, Luminex, qRT-PCR, western blots anti-fator, e imuno-histoquímica de fator sobre células ou amostras de tecido.

[00168] Determinação quantitativa de fatores modulatórios em células e meios condicionados pode ser realizada usando kits de ensaio comercialmente disponíveis (e.g., R&D Systems que se baseia em um ensaio baseado em anticorpo substrativo de duas etapas).

[00169] A invenção inclui métodos para produzir células com potência aumentada como aqui descrito. Consequentemente, a invenção inclui métodos para identificar compostos que aumentam a capacidade da célula para ter

qualquer um dos efeitos aqui descritos pela exposição das células a um composto e pelo ensaio para a capacidade das células para realizar o efeito em qualquer nível desejado. Em uma modalidade, algumas células contatam com células endoteliais ativadas antes da produção de fatores que têm os efeitos aqui descritos. Estas células podem ser chamadas de “inexperientes”. Consequentemente, em uma modalidade, é possível substituir o efeito de células endoteliais ativadas pelo uso de compostos que dizem respeito à descoberta de droga descrita neste pedido. Em uma modalidade, por exemplo, os inventores têm verificado que uma combinação de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$  pode ser substituinte do contato com células endoteliais ativadas como resumidamente descrito na seção exemplar. Consequentemente, células podem ser selecionadas com qualquer um de numerosos compostos para identificar compostos que permitem esta substituição. Estes compostos podem ser então usados para pré-tratar células inexperientes para qualquer um dos usos terapêuticos descritos neste pedido, bem como para produzir composições que são úteis para aplicações clínicas, terapêuticas, e diagnósticas e preparação de banco de células.

#### Exemplos de ensaios específicos

- [00170]        1. Análise por FACS de células endoteliais para examinar a presença de moléculas de adesão após co-cultura com MAPCs ou incubadas com meios condicionados de MAPCs.
- [00171]        2. Quantificação de ligação de neutrófilos em co-cultura de células endoteliais com MAPCs ou incubadas com meios condicionados de MAPCs.
- [00172]        3. Quantificação de atividade de NF- $\kappa$ B usando sistema baseado em promotor após co-cultura com MAPCs ou incubadas com meios condicionados de MAPCs.
- [00173]        4. Quantificação de extravasão de leucócitos por intermédio de camada endotelial usando um sistema baseado em ECIS ou sistema similar,

após a camada endotelial ter sido cultivada com MAPCs incubada com meios condicionados d MAPCs.

[00174] Ensaios para potência também podem ser realizados pela detecção de fatores ativos secretados pelas células. Estes podem incluir glicocorticóides, HB-EGF, IL-10, Prostaglandina A1, IL-13, IL-1R, IL-18R, IFN-R, TNF-R1, TNF-R2, IL-4, IL-11, IFN- $\beta$ , TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3, Prostaglandina E2, SPP1, CYLD, Elastase, VEGF, IL-33, tumosina B4 e adrenomedulina TGF- $\beta$ . Detecção pode ser direta, e.g., via ensaios de RNA ou de proteína ou indireta, e.g., ensaios biológicos para um ou mais dos efeitos biológicos destes fatores.

[00175] Um uso adicional da invenção é o estabelecimento de bancos de células para fornecer células para administração clínica. Geralmente, uma parte fundamental deste procedimento é fornecer células que têm uma potência desejada para administração em vários ambientes clínicos terapêuticos.

[00176] Qualquer um dos mesmos ensaios úteis para descoberta de droga poderia também ser aplicado para selecionar as células para o banco bem como do banco para administração.

[00177] Consequentemente, em um procedimento de preparação de banco, as células (ou o meio) seriam ensaiadas para a capacidade para realizar qualquer um dos efeitos acima. Então, seriam selecionadas as células que têm uma potência desejada para qualquer um dos efeitos acima, e estas células formariam a base para a formação de um banco de células.

[00178] Também é contemplado que a potência pode se aumentada pelo tratamento com um composto exógeno, tal como um composto descoberto por intermédio de seleção das células com grandes bibliotecas combinatórias. Estas bibliotecas de compostos podem ser bibliotecas de agentes que incluem, mas não são limitados a, moléculas orgânicas pequenas, ácidos nucleicos de anti-senso, aptâmeros de siRNA DNA, peptídeos,

anticorpos, proteínas de não-anticorpo, citocinas, quimiocinas, e quimioatraentes. Por exemplo, as células podem ser expostas a tais agentes em qualquer tempo durante o procedimento de crescimento e de manutenção. A única exigência é que haja números suficientes para o ensaio desejado ser conduzido para avaliar se ou não o agente aumenta a potência. Um tal agente, encontrado durante o processo de descoberta de droga geral descrito acima, poderia ser mais vantajosamente aplicado durante a última passagem antes da preparação do banco.

[00179] Células são isoladas de um doador de medula óssea qualificado que tem sofrido exigências de teste específicas para determinar que um produto de células que é obtido deste doador seria seguro para ser usado em um ambiente clínico. As células mononucleares são isoladas usando um procedimento quer manual quer automático. Estas células mononucleares são plaqueadas em cultura permitindo que as células adiram na superfície tratada de um vaso de cultura de células. As células MAPC são permitidas se expandirem sobre a superfície tratada com mudanças de meio ocorrendo no dia 2 e no dia 4. No dia 6, as células são removidas do substrato tratado por meio que mecânico quer enzimático e replaqueadas sobre outra superfície de um vaso de cultura de células. Nos dias 8 e 10, as células são removidas da superfície tratada como antes e replaqueadas. No dia 13, as células são removidas da superfície tratada, lavadas e combinadas com um material crioprotetor e congeladas, finalmente, em nitrogênio líquido. Após as células terem sido congeladas por pelo menos uma semana, uma alíquota das células é removida e testada para potência, identidade, esterilidade e outros testes para determinar a utilidade do banco de células. Estas células neste banco podem ser então usadas pelo descongelamento delas, posicionamento delas em cultura e uso delas fora do congelamento para tratar indicações potenciais.

[00180] Outro uso é um ensaio diagnóstico para eficiência e efeito clínico benéfico após administração das células. Dependendo da indicação,

pode haver biomarcadores disponíveis para avaliar. Por exemplo, níveis altos de proteína-C reativa (CRP) estão associados com resposta inflamatória aguda. Poder-se-ia monitorar os níveis de CRP para determinar os efeitos clínicos benéficos.

[00181] Um outro uso é avaliar a eficácia da célula para realizar qualquer um dos resultados acima como um diagnóstico de pré-tratamento que precede a administração das células a um sujeito.

### Composições

[00182] A invenção também é direcionada às populações de células com potências específicas para realizar qualquer um dos efeitos aqui descritos (i.e., inflamação, extravasão, adesão, redução de ativação endotelial, etc.). Como descrito acima, estas populações são estabelecidas pela seleção de células que têm a potência desejada. Estas populações são usadas para preparar outras composições, por exemplo, um banco de células compreendendo populações com potências desejadas específicas e composições farmacêuticas contendo uma população de células com uma potência desejada específica.

### EXEMPLOS

#### Exemplo 1

[00183] MultiStem® é a designação de marca comercial para a preparação de células MAPC usada nos procedimentos experimentais descritos neste Exemplo.

Células progenitoras adultas multipotentes modulam expressão em superfície de molécula de adesão de célula endotelial após ativação e reduz inflamação após AMI

#### Análise racional / fundamento

[00184] Localização de células imunes em um sítio de inflamação é uma parte importante da resposta imune à lesão ou infecção. Em resposta à inflamação, células imunes incluindo leucócitos, linfócitos e monócitos se

ligam em, e se transmigram através da, camada celular endotelial para o sítio de lesão<sup>1,2</sup>. Células endoteliais podem ser ativadas por trombina, citocinas pro-inflamatórias (e.g. TNF- $\alpha$ , Interleucina 1 $\beta$  e radicais de oxigênio que acarreta a supra-regulação de moléculas de adesão incluindo E-selectinas, V-CAM e I-CAM-1<sup>3,5</sup>. Supra-regulação de moléculas de adesão celular sobre superfície celular de células endoteliais permite que células imunes ativadas adiram, rolem e transmigrem através da barreira de célula endotelial<sup>4</sup>.

[00185] Embora mobilização do sistema imune seja uma parte crítica da resposta imune à infecção e à cicatrização do ferimento, inflamação após lesão isquêmica pode contribuir para toxicidade e morte celular. Por exemplo, após infarto miocárdial agudo, um aumento em infiltração de neutrófilos está associado com um risco aumentado de eventos adversos em pacientes tratados com terapia trombolítica e angioplastia primária<sup>6,8</sup>. A extensão da resposta inflamatória ao infarto miocárdial tem um papel significativo em determinação do tamanho do infarto e subsequente remodelagem ventricular esquerda (*left ventricular, LV*)<sup>10</sup>. Localização de neutrófilos no coração contribui para lesão miocárdial pela liberação de proteases e espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species, ROS*) que contribuem para remodelagem ventricular esquerda. Adicionalmente, neutrófilos contribuem para lesão microvascular e capilar pelo bloqueio de capilares em um fenômeno descrito como “sem refluxo”<sup>11</sup>. Um desequilíbrio pro-inflamatório para células T *helper 1* (Th1) contribui para dilatação ventricular esquerda, disfunção sistólica e função reduzida<sup>12</sup>. Portanto, modulação da resposta de célula inflamatória e neutrófilo após AMI ajudaria a reduzir lesão no miocárdio.

[00186] MultiStem® são células progenitoras adultas multipotentes alogênicas de grau clínico e humano expandidas que, como tem sido demonstrado, melhoraram a função cardíaca após AMI em modelos pré-clínicos e estão agora em testes clínicos de Fase I<sup>13-15</sup>. Liberação de MultiStem para

dentro de sítios de peri-infarto após indução de infarto miocárdial por ligação descendente anterior esquerda direta resulta em função cardíaca melhorada em modelos animais. Comparados com controles de veículo, animais tratados com MultiStem nestes estudos mostraram desempenho contrátil ventricular esquerdo aperfeiçoado, área de cicatriz decrescida, densidade vascular aumentada e características energéticas miocárdias melhoradas<sup>14,16,17</sup>. Devido aos níveis baixos de enxerto de MultiStem e diferenciação mínima de MultiStem em células endoteliais e miocárdias, acredita-se que os benefícios de MultiStem durante AMI são derivados dos efeitos parácrinos.

[00187] Estudos prévios têm documentado que MultiStem de humano e roedor exibe propriedades imunossupressivas potentes, e demonstraram que culturas de MultiStem são não-imunogênicas in-vitro e capazes de suprimir proliferação de célula-T ativada por anticorpo<sup>13,15</sup>. Foi levantada a hipótese de que propriedades antiinflamatórias ou imunossupressivas de MultiStem se estendem às células endoteliais e que MultiStem pode conceder benefício durante AMI, em parte, por intermédio de imunomodulação de ativação de célula endotelial e adesão de célula imune que resulta em infiltração de neutrófilos decrescida.

[00188] Neste estudo, MultiStem foi examinado para determinar se ele pode modular ativação de célula endotelial pelo exame da supra-regulação de moléculas de adesão celular na superfície celular. Foi verificado que co-cultura de MultiStem com células endoteliais pulmonares ou aórticas previne supre-regulação de E-selectina, V-CAM e em um grau menor, I-CAM, na superfície celular de células endoteliais sob ativação com TNF- $\alpha$ . Supra-regulação de E-selectina não parece ser um resultado de clivagem aumentada da superfície celular. Ao contrário, MultiStem modula a supra-regulação em superfície celular por meio de diminuição de transcrição de V-CAM, I-CAM, e E-selectina. A redução em expressão de molécula de adesão em superfície celular observada sob co-cultura com MultiStem resulta em ligação de

neutrófilo diminuída em células endoteliais em comparação com os controles não tratados. Esta atividade não é comum para todas as células-tronco aderentes derivadas de medula óssea porque MSC são incapazes de modular supr-regulação em superfície celular de V-CAM, E-selectina ou I-CAM com TNF- $\alpha$ . Estes resultados sugerem que MSC e MultiStem têm perfis de secreção distintos em resposta aos sinais inflamatórios. Com o propósito de determinar se ativação de célula endotelial decrescida poderia reduzir inflamação e infiltração de neutrófilos após infarto miocardial agudo, os efeitos de MultiStem sobre redução de resposta inflamatória induzida por um evento isquêmico foram examinados em um modelo de AMI em rato. Níveis decrescidos de infiltração de neutrófilos foram encontrados, correlacionados com níveis decrescidos de elastase de tecido de neutrófilo em corações tratados com MultiStem após ligação com LAD permanente em comparação com os controles tratados com veículo.

### Materiais e métodos

#### Cell Culture

[00189] Células endoteliais aórticas de humano (*Human Aortic Endothelial Cells*, HAEC) foram adquiridas de Lonza (Walkersville, MD, <http://www.lonza.com>) e cultivas de acordo com as instruções do fabricante para passagem 7 usando Meio-2 de Crescimento Endotelial (*Endothelial Growth Medium-2*, EGM-2) de Lonza. Células endoteliais microvasculares pulmonares de humano (*Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells*, HPMEC) foram adquiridas de ScienCell (Carlsbad, CA, [www.scientellonline.com](http://www.scientellonline.com)) e cultivas de acordo com as instruções do fabricante para passagem 4 usando Meio de Célula Endotelial (*Endothelial Cell Medium*, ECM) de ScienCell. Células-Tronco Mesenquimais de Humano (*Mesenchymal Stem Cells* MSC) foram adquiridas de Lonza e cultivas de acordo com as instruções do fabricante para passagem 6 usando Meio de Crescimento de Célula-Tronco Mesenquimal (*Mesenchymal Stem Cell*

*Growth Medium, MSCGM*) de Lonza. Human MultiStem de humano foi cultivado como descrito<sup>18</sup>.

#### Ensaio de co-cultura endotelial

[00190] Quer HAEC quer HPMEC foram plaqueadas no fundo de placas Transwell de membrana de 0,4 µm de 6 cavidades (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, <http://www.fishersci.com>) a  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> em seus respectivos meios de crescimento e incubadas por três dias em uma atmosfera umidificada, de 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. O meio foi aspirado e as células lavadas com PBS. 2 ml de meio MultiStem® foram adicionados por cavidade e insertos contendo 1:1, 1:4, 1:10, ou 1:20 (HAEC: MultiStem). MultiStem em 1 ml de meio MultiStem foi plaqueado nas cavidades. 10 ng/ml de Fator alfa de Necrose Tumoral recombinante de humano (*recombinant human Tumor Necrosis Factor alpha*, rhTNFα) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, <http://www.sigmaaldrich.com>) foram adicionados em cada cavidade. Controles consistindo de apenas células endoteliais (- rhTNFα), apenas células endoteliais +10 ng/ml de rhTNFα, e co-cultura 1:1 (- rhTNFα) também foram preparados. Controles foram realizados em 3 ml de meio MultiStem. As amostras foram então incubadas por três dias em uma atmosfera umidificada, de 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C. Alternativamente, MSC e MSCGM foram usadas no lugar de MultiStem e meio MultiStem para estudos comparativos. O ensaio também foi realizado usando 10 ng/ml de Interleucina 1β recombinante de humano (*recombinant human Interleukin 1β*, rhIL-1β) de Sigma-Aldrich no lugar de rhTNFα.

#### Análise citométrica de fluxo

[00191] Células foram soltas das placas de seis cavidades usando 50/50 PBS/Enzyme Free (Millipore, Billerica, MA, <http://www.millipore.com>), centrifugadas a 1.600 rpm por 5 min e ressuspensas em 600 µL de PBS. Cada amostra foi dividida igualmente em três tubos para coloração citométrica de fluxo. As células foram incubadas com 20 µL de anticorpos para que CD 106

FITC conjugado (V-CAM1), CD54 PE conjugado (I- CAM1), quer CD62E PE conjugado (E-Selectina) de BD Pharmingen (San Jose, CA, <http://www.bdbiosciences.com>) por 40 minutos a 4°C no escuro. Adicionalmente, controles de isótipo foram realizados usando FITC Mouse IgG1κ ou PE Mouse-β (BD Pharmingen). As células foram lavadas com 2 ml de PBS e centrifugadas a 1.600 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi jogado fora e as células foram ressuspensas em 200 µL de PBS + 1% de paraformaldeído (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, <http://www.electronmicroscopysciences.com>). Análise por citometria de fluxo foi realizada em um citômetro de fluxo FACS Vantage SE (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, California) equipado com um laser de argônio de 488-nm. Emissão de fluorescência de PE (FL2) foi detectada usando um filtro de passagem de banda 585/42. Aquisição de dados e análise foram realizadas usando o programa de computador CellQuest™ (Becton Dickinson).

### Imunofluorescência

[00192] Sobrelâminas de 12 mm de Microscópio (Fisher Scientific) foram posicionadas no fundo das placas Transwell de 6 cavidades antes da plaqueação de HAEC para o ensaio de co-cultura. As células foram bloqueadas com soro de macaco 10% (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, <http://www.jacksonimmuno.com>) por 1 hora na temperatura ambiente seguido por uma incubação durante a noite com um a diluição 1:50 de anticorpo monoclonal de camundongo anti-E-Selectina de humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, <http://www.scbt.com>) a 4°C com agitação suave. As células foram então lavadas quatro vezes por cinco minutos cada com PBS-T seguido por incubação por uma hora na temperatura ambiente com diluição 1:400 de AlexaFluor 488 de macaco anti-camundongo (Invitrogen, Carlsbad, CA, <http://www.invitrogen.com>). As células foram então lavadas quatro vezes por cinco minutos com PBS-T.

Imagens foram obtidas em magnificação de 100X usando um microscópio Leica (Leica, Microsystems, Bannockburn, IL, <http://www.leicamicrosystems.com>), câmara Optronics e programa de computador Magnafire (Optronics, Goleta, CA, <http://www.optronics.com>).

### ELISA

[00193] O meio foi coletado após o ensaio de co-cultura e amostras duplamente diluídas foram usadas em um ELISA para E-Selectina solúvel (R&D Systems, Minneapolis, MN, <http://www.mdsystems.com>) de acordo com as instruções do fabricante.

### RT-PCR

[00194] Células foram soltas das placas Transwell de 6 cavidades usando Tripsina-EDTA 0,25% (Invitrogen), centrifugadas, e ressuspensas em 1,8 mL de tampão de lise. RNA foi extraído usando Absolutely RNA Miniprep kit (Stratagene, La Jolla, CA, <http://www.stratagene.com>) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi eluido em 65 µL do tampão de eluição fornecido. RT-PCR foi realizada usando 100 pmol de Random Primers (Promega, Madison, WI, <http://www.promega.com>). RT positiva e RT negativa bem como água foram aplicadas em placas de 96 cavidades.

### Ensaio de ligação de neutrófilos

[00195] Neutrófilos foram isolados de sangue periférico de voluntários saudáveis. Após isolamento, neutrófilos foram ativados por 10 minutos pela adição de LPS (0,1 µg/ml) por 10 minutos a 37 graus. HAECS foram incubados com ou sem TNF-, MultiStem ou MSC como descrito acima por 72 horas. O meio foi então removido, as células foram lavadas e células endoteliais foram então incubadas com neutrófilos ativados por 1 minuto. As células endoteliais foram então lavadas com PBS quatro vezes para remover quaisquer neutrófilos não ligados. Após múltiplas lavagens, ligação de neutrófilos em células endoteliais foi examinada por microscopia (objetiva de 20x) e fotografadas. Neutrófilos ligados na camada endotelial foram contados

em cada campo. Cada condicionado foi realizado triplamente e três campos foram fotografados por cavidade.

#### Estudos em animal

[00196] Preparação de célula - em cada dia de injeções de células, MultiStem foi descongelado e testado para viabilidade. Células mostrando >90% de viabilidade foram ressuspensas em PBS a 50 milhões de células/mL. Experimentos de descongelamento prévios indicaram que células MultiStem permaneceram >95% viáveis sob estas condições por até 8 h.

[00197] Cirurgia de animal - todos os procedimentos experimentais em animal descritos neste estudo foram realizados sob os protocolos aprovador pelo Animal Research Committee of the Cleveland Clinic Foundation (Cleveland, Ohio, USA). Ratos machos Lewis, pesando entre 150 e 175 g, foram anestesiados com uma injeção i.p. de uma mistura de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) e foram ventilados com ar da sala em 80 respirações/minuto (RSP1002, Kent Scientific Corp, Torrington, CT). Infarto miocárdial de parede anterior foi induzido em 25 ratos por esternotomia e ligação cirúrgica da artéria descendente anterior esquerda. Ligação de LAD foi confirmada pelo branqueamento do tecido distal à sutura. Após ligação LAD, 10 milhões de células de rato Lewis MultiStem (50 milhões de células/ml) ou PBS sozinha foram injetados no coração na área circundando a região infartada. Os animais foram mortos três dias após a cirurgia. Os corações de 10 animais (5 tratados com veículo 5 tratados com MultiStem) foram imersos em OCT e usados para congelar seções finas. Seções foram subsequentemente coradas para elastase (para determinar contagens de neutrófilos)

#### Estatística

[00198] Análise estatística foi realizada usando teste-T de Student ou ANOVA com análise post-hoc quando apropriada com  $p < 0,05$  aceito como estatisticamente significativo. Barras de erro são expressadas como desvio

padrão.

## Resultados

### MultiStem previne a supra-regulação de moléculas de adesão celular sob ativação

[00199] Expressão de moléculas de adesão sobre a superfície celular de células endoteliais aumenta dramaticamente sob exposição às citocinas pro-inflamatórias tal como TNF- $\alpha$ . Para testar se MultiStem pode modular esta resposta, MultiStem foi co-cultivada com células endoteliais aórticas de humano (*human aortic endothelial cells*, HAECs) na presença ou ausência de TNF- $\alpha$  por três dias. Subsequentemente, a expressão em superfície celular de E-selectina, V-CAM e I-CAM foi medida por análise por FACs ou imunocoloração (Figura 1A). Após 72 horas, TNF- $\alpha$  induziu níveis altos de todos os três marcadores na ausência de MultiStem em comparação com os controle inativados. Verificamos, contudo, que na presença de MultiStem, numerosas células com expressão em superfície de E-selectina (Figura 1B) ( $p=0,0149$ ) e V-CAM ( $p=0,0037$ ) foi significativamente reduzida (Figure 1B) Adicionalmente, o nível de expressão em superfície celular de I-CAM ( $p =0,001$ ) foi reduzido em doses mais altas de MultiStem (Figura 1C). A modulação de supra-regulação de molécula de adesão de superfície celular por MultiStem é dependente de dose de célula, é reduzida com concentrações decrescentes de MultiStem e é reproduzível com MultiStem derivada de doadores diferentes (dados não mostrados). Para examinar se este efeito foi específico para TNF- $\alpha$ , este experimento foi repetido usando interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Similar aos resultados com TNF- $\alpha$ , co-cultura com MultiStem inibiu supra-regulação de molécula de adesão (E-selectina, V-CAM e I-CAM) na superfície celular quando ativada com IL-1 $\beta$  em comparação com controles (Figura 2B) .

[00200] A seguir, foi determinado se infra-regulação da expressão em superfície de de moléculas de adesão celular na presença de MultiStem foi

uma resposta específica endotelial ou se outras linhagens de célula endotelial também responderam à MultiStem em uma maneira similar. Células endoteliais microvasculares pulmonares de humano (*human pulmonary microvascular endothelial cells*, HPMECs) foram testadas para ver se estas células infra-regularam expressão em superfície celular de moléculas de adesão celular induzida por TNF- $\alpha$  em resposta à MultiStem em uma maneira similar à de HAECS (Figura 2A). O número de HPMECs expressando E-selectina ( $p<0.0001$ ) e V-CAM ( $p<0.0001$ ) induzidas por TNF- $\alpha$  sobre sua superfície celular foi reduzido após co-cultura com MultiStem. Similarmente, expressão de I-CAM em superfície celular foi também significativamente reduzida em células co-cultivadas com dose mais alta de MultiStem ( $p =0,028$ ) (Figura 2A). Visto que estes experimentos foram realizados em transwells, interação direta entre MultiStem e células endoteliais não é exigida para MultiStem modular ativação de marcador de adesão de célula endotelial. Estes dados portanto sugerem que fatores solúveis secretados de MultiStem atuam em uma maneira parácrina para reduzir expressão de molécula de adesão em superfície endotelial.

MultiStem não aumenta desprendimento de moléculas de adesão mas em vez disso funciona pela prevenção de uma indução de expressão de RNA de molécula de adesão

[00201] Um mecanismo possível pelo qual MultiStem poderia decrescer a expressão em superfície celular de moléculas de adesão tal como E-selectina é aumentar a clivagem daquelas moléculas da superfície celular. Clivagem de moléculas de adesão da superfície celular é mediada por diferentes proteases incluindo metaloproteases tal como TACE/ADAM17. Estudos prévios sugeriram que moléculas de adesão solúveis podem ser patológicas e podem contribuir para ativação de neutrófilo <sup>19,20</sup>. Tratamento com MultiStem foi examinado para determinar se ela decresce expressão de E-selectina em superfície pelo aumento do desprendimento de E-Selectina de

superfície. Os níveis de E-selectina solúvel secretada para dentro do meio condicionado pelas células endoteliais na presença ou ausência de MultiStem foram medidos por ELISA. Não foi verificado aumento em concentração de sE-selectina em meio condicionado coletado de co-cultura de MultiStem quer com HAECS quer com HPMECS (Figura 3A, dados não mostrados). Inversamente, um decréscimo em E-selectina solúvel foi verificado em meio de HAECS ( $p < 0,001$ ) e HPMECs ( $p < 0,001$ ) ativadas TNF- $\alpha$  co-cultivadas com MultiStem em proporções mais altas, sugerindo que o decréscimo em expressão de E-selectina em superfície é uma consequência da expressão decrescida em superfície com subsequente redução no desprendimento de E-Selectina solúvel (Figura 3A). Portanto, o decréscimo em expressão de E-selectina em superfície não é devido à clivagem aumentada desta molécula da superfície celular, implicando que o decréscimo em moléculas de adesão celular sobre a superfície de células endoteliais não é um resultado de clivagem proteolítica destas moléculas.

[00202] Visto que as moléculas de adesão em superfície celular E-selectina, V-CAM e I-CAM são todas transcripcionalmente ativadas em células endoteliais quando tratadas com citocinas pro-inflamatórias tal como TNF- $\alpha$ , foi determinado se MultiStem poderia modular a regulação destas moléculas de adesão em nível transcripcional (Figura 3). Células endoteliais (HAECS) foram co-cultivadas com MultiStem na presença ou na ausência de TNF- $\alpha$  por 72 horas. RNA foi subsequentemente isolado das células endoteliais e reversamente transcrito em cDNA. PCR quantitativa foi então realizada usando iniciadores para E-selectina, V-CAM, I-CAM e GAPDH. Níveis de expressão de mRNA foram todos normalizados para a níveis de GAPDH (Figura 3B). Estes resultados indicam que níveis de E-selectina, V-CAM, e I-CAM mRNA são reduzidos na presença de MultiStem, sugerindo que MultiStem inibe supra-regulação induzida por TNF- $\alpha$  destes genes. Resultados similares foram vistos quando MultiStem foi co-cultivada com

células endoteliais pulmonares (HPMECs, dados não mostrados). Ativação transcricional de V-CAM, I-CAM e E-selectina por TNF- $\alpha$  é dependente de NF- $\kappa$ B, sugerindo que MultiStem pode modular sinalização de NF- $\kappa$ B em algum nível.

Diferente de MultiStem, MSC não modula significativamente expressão de molécula de adesão celular

[00203] Também tem sido mostrado que outras células-tronco derivadas de medula óssea modulam a função imune pela prevenção de proliferação de célula-T, suprimindo a função de célula exterminadora natural e modulando os distúrbios imunes tal como doença de Crohn e GVHD em modelos animais. Com o propósito de avaliar se os efeitos imunomodulatórios de MultiStem sobre ativação de célula endotelial também foram produzidos por outras linhagens de célula-tronco, células endoteliais foram co-cultivadas com MSC na presença de TNF- $\alpha$  por 72 horas e a expressão em superfície da molécula de adesão celular foi subsequentemente examinada. Surpreendentemente, expressão, induzida por TNF- $\alpha$ , de molécula de adesão celular em superfície não é modificada na presença de MSC em comparação com controles, enquanto que MultiStem significativamente reduz a expressão de molécula de adesão (Figuras 4A-C). Um decréscimo pequeno em expressão de E-selectina em superfície foi observado com MSC na dose mais alta, contudo, esta mudança foi significativamente menor do que a redução vista na presença de MultiStem (Figura 4A). Portanto, MSC não modula supra-regulação de molécula de adesão por TNF- $\alpha$ . Estes resultados mostram que MultiStem tem um perfil de secreção funcionalmente diferente de MSC que é refletido em diferenças em sua atividade biológica.

Co-cultura de células endoteliais ativadas com MultiStem previne ligação de neutrófilos

[00204] Tem sido mostrado que supra-regulação de moléculas de adesão celular sobre a superfície celular de células endoteliais é crítica para

rolamento e adesão firme de células imunes tais como neutrófilos<sup>4</sup>. Com o propósito de determinar se a modulação de supra-regulação de molécula de adesão em superfície celular por MultiStem é suficiente para afetar a ligação de neutrófilo em células endoteliais, ligação de neutrófilos em células endoteliais tratadas com MultiStem foi comparada com a de células endoteliais não tratadas. Células endoteliais foram crescidas para uma monocamada confluente, tratadas com TNF- $\alpha$  por 72 horas na presença ou ausência de MultiStem. Neutrófilos foram isolados de pelo menos 2 doadores diferentes, ativados pela adição de LPS (0,1  $\mu$ g/ml) e incubados com células endoteliais por um minuto. Após lavagens múltiplas, ligação de célula endotelial e neutrófilo foi examinada por microscópio (objetiva 10x) e fotografadas. Neutrófilos ligados na camada endotelial foram contados em cada campo (Figure 5A). Neutrófilos ativados ou não ativados ligaram-se apenas em níveis baixos em células endoteliais inativadas. Contudo, sob ativação com TNF- $\alpha$ , foi visto um aumento significativo em neutrófilos ligados, como esperado (Figura 5B). Quando células endoteliais foram pré-incubadas com MultiStem, ligação de neutrófilos foi significativamente reduzida ( $p < 0,0001$ ). Estes resultados demonstram que a mudança em expressão de molécula de adesão sobre células endoteliais é suficiente para mudar as características de ligação de camada de células endoteliais em neutrófilos. Em contraste, co-cultura de MSC com as células endoteliais durante a ativação com TNF- $\alpha$  não alterou a ligação de neutrófilo. Adicionalmente, quando células endoteliais ativadas por, TNF- $\alpha$ , sozinhas ou em co-cultura com MSC, foram expostas aos neutrófilos, houve uma mudança significativa em morfologia celular endotelial para um tipo celular mais fino mais longo e um decréscimo em contato de célula-célula (Figura 5C). Em células endoteliais co-cultivadas com MultiStem quando ativadas com TNF- $\alpha$ , a morfologia celular não muda muito e o contato de célula-célula é mantido. Estes dados sugerem que a funcionalidade de MultiStem altera as células

endoteliais ativadas. Portanto, MultiStem foi testada para determinar se poderia afetar a migração de neutrófilo in vivo.

Tratamento com MultiStem decresce infiltração de neutrófilo após infarto miocárdial agudo induzido por LAD

[00205] Estudos prévios em animal têm mostrado que a injeção direta de MultiStem em sítios de peri-infarto após infarto miocárdial, induzido por ligação descendente anterior esquerda direta, resulta em função cardíaca melhorada<sup>14,16</sup>. Os resultados neste relatório mostram que MultiStem pode infra-regular a expressão em superfície celular de moléculas de adesão (E-selectina, V-CAM e I-CAM) na presença de TNF- $\alpha$ . Estas moléculas são críticas para adesão e extravasão de neutrófilos através do endotélio. Visto que infiltração de neutrófilos para dentro do coração após isquemia pode ser prejudicial e pode resultar em função cardíaca decrescida após uma lesão isquêmica<sup>10,11</sup>, foi levantada a hipótese de que melhoria em função cardíaca após tratamento com MultiStem foi devido, em parte, às reduzidas inflamação e infiltração de neutrófilos para dentro da zona de peri-infarto após AMI. Para testar esta hipótese, os níveis de neutrófilos presentes no coração foram examinados após infarto miocárdial induzido em ratos.

[00206] Infarto miocárdial de parede anterior foi induzido em ratos por ligação da artéria descendente anterior esquerda (ligação LDA, *left anterior descending LAD artery*). Após ligação LAD, 10 milhões de células MultiStem Lewis de Rato ou apenas PBS foram injetadas no coração na área circundando a região infartada. Animais foram mortos três dias após a cirurgia, quando a resposta inflamatória estava em seu pico. Os corações de 10 animais (5 tratados com veículo e 5 tratados com MultiStem) foram seccionados e corados para elastase para determinar a extensão da infiltração de neutrófilos. Infiltração de neutrófilos foi examinada dentro da zona de peri-infarto (dentro de 0,25-0,5 cm de tecido infartado) para ambos os animais tratados e não tratados (Figura 6).

[00207] Três dias após tratamento celular e com AMI, animais tratados com MultiStem exibiram infiltração de neutrófilo significativamente menor para dentro da área de peri-infarto, em comparação com os controles tratados com veículo (12,185 neutrófilos por campo de potência alta (*high powered field*, Hpf) versus 35,25 neutrófilos/Hpf,  $p=0,005823$ ) (Figura 6 A-C). Células positivas para elastase foram contadas em quatro campos de potência alta por animal e a média foi calculada (Figura 6 B,C). Estes resultados confirmam que MultiStem tem um efeito antiinflamatório sobre o coração após AMI. Estes dados também sugerem que o decréscimo observado em supra-regulação de moléculas de adesão em células endoteliais sob ativação por TNF- $\alpha$  em cultura pode se traduzir *in vivo* em uma mudança funcional da barreira de células endoteliais na presença de MultiStem.

### Conclusões

[00208] Neste estudo, MultiStem foi examinada para determinar se poderia modular ativação de células endoteliais em resposta aos estímulos inflamatórios. MultiStem são células progenitoras multipotentes de grau clínico expandidas em grande escala (MAPC). Os resultados mostram que ambas as células endoteliais pulmonares e aórticas tiveram expressão reduzida, em superfície celular, de moléculas de adesão E-selectina, V-CAM e I-CAM quando ativadas com TNF- $\alpha$  ou IL-1 $\beta$  quando co-cultivadas com MultiStem em comparação com controles não tratados. Adicionalmente, os experimentos demonstram que o decréscimo em expressão de E-selectina não é devido ao desprendimento reduzido desta molécula da superfície celular. Ao contrário, expressão de V-CAM, E-selectina e I-CAM mRNA é reduzida em comparação com as células endoteliais sozinhas tratadas com TNF- $\alpha$ , sugerindo que MultiStem é moduladora da transcrição aumentada destas proteínas em resposta aos sinais inflamatórios. Ademais, foi observado que adesão de neutrófilos em células endoteliais ativadas também foi decrescida quando células endoteliais foram incubadas com MultiStem durante ativação

com TNF- $\alpha$ . Com o propósito de investigar se estas mudanças foram relevantes in vivo, tratamento com MultiStem foi examinado para determinar se modularia inflamação após lesão isquêmica. De fato, infiltração de neutrófilos foi reduzida no peri-infarto em animais tratados com MultiStem três dias após AMI em ratos em comparação com os controles tratados com veículo.

[00209] O mecanismo molecular responsável pela infra-regulação das moléculas de adesão celular sobre células endoteliais ativadas na presença de MultiStem ainda não tem sido caracterizado. Contudo, visto que os estudos de co-cultura foram realizados em transwells, MultiStem precisam estar secretando um ou mais fatores solúveis para dentro do meio que subsequentemente atuam sobre células endoteliais para prevenir ou intra-regular a transcrição destas integrinas e selectinas. Sob ligação de citocinas tais como TNF- $\alpha$  ou IL-1 $\beta$  em seus receptores, iniciação de sinalização interna resulta em transcrição dependente de sinalização de NF- $\kappa$ B. Transcrições de E-selectina, I-CAM e V-CAM são todas dependentes de NF- $\kappa$ B, sugerindo que MultiStem pode modular a sinalização de NF- $\kappa$ B.

[00210] Embora tenha sido mostrado que MSCs têm propriedades imunomodulatórias em outros ambientes, MSCs não previnem a supra-regulação de molécula de adesão celular em células endoteliais ativadas quando co-cultivadas com estas células. Expressão de V-CAM e I-CAM não exibiu qualquer infra-regulação sob co-cultura com qualquer dose de MSC. Na dose mais elevada de MSC, E-selectina foi modestamente reduzida da superfície celular em comparação com os controles não tratados. Contudo, expressão de E-selectina em superfície foi significativamente maior quando células endoteliais foram co-cultivadas com MultiStem. Adicionalmente, nenhum efeito foi observado sobre E-selectina quando células endoteliais ativadas foram co-cultivadas com MSCs em doses menores. Estes resultados têm poucas implicações. Primeira, o mecanismo utilizado por MSC para

modular proliferação de célula-T é diferente do mecanismo utilizado por MultiStem para infra-regular marcadores de superfície de célula endotelial, sugerindo que células-tronco podem modular função imune através de múltiplas vias. Segunda, estes resultados implicam que MultiStem e MSCs têm perfis de secreção distintos que são refletidos em diferenças nas atividades funcionais destes dois tipos de células. Estas diferenças podem informar qual o tipo de célula pode ser melhor para potencialmente tratar várias indicações clínicas, com cada tipo de célula melhor ajustado para uso em uma classe distinta de indicações. Pesquisa adicional em diferenças entre estes tipos de célula-tronco e seus mecanismos de ação ajudará no elucidação destes problemas.

[00211] Embora os efeitos de MultiStem sobre células endoteliais tenham sido examinados no contexto de AMI, adesão de linfócitos e leucócitos no endotélio é uma parte crítica do processo inflamatório e por conseguinte, prejudicial em muitos distúrbios, incluindo outras lesões isquêmicas, tal como derrame cerebral, bem como distúrbios imunes tais como GVHD, síndrome da angústia respiratória aguda (*acute respiratory distress syndrome*, ARDS), e esclerose múltipla. Os resultados mostram que MultiStem modula supra-regulação de molécula de adesão celular em pelo menos dois tipos de células endoteliais, aórtico e pulmonar sob ativação com duas citocinas diferentes, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Este estudo sugere que a atividade imunomodulatória de MultiStem se estende para uma multiplicidade de tipos de células endoteliais e sinais inflamatórios. Assim, tratamento com MultiStem pode fornecer benefício em distúrbios nos quais infiltração de células imunes através do epitélio resulta em dano e lesão aumentados.

### Referências

- [00212] 1. Wagner et al. The vessel wall and its interactions. *Blood*. Jun 1 2008; 111(11):5271-5281.
- [00213] 2. Golias C, Tsoutsi E, Matziridis A, Makridis P, Batistatou A,

Charalabopoulos K. Review. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusando on inflammatory heart disease. In vivo (Athens, Greece). Sep-Oct 2007;21(5):757-769.

- [00214] 3. Bullard et al., Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *The Journal of experimental medicine*. May 1, 1996; 183(5):2329-2336.
- [00215] 4. Rao et al., Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circulation research*. Aug 3 2007;101(3):234-247.
- [00216] 5. Frenette et al., Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell*. Feb 23 1996;84(4):563-574.
- [00217] 6. Furman et al., Effect of elevated leukocyte count on in-hospital mortality following acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology*. Oct 15 1996;78(8):945-948.
- [00218] 7. Menon et al., Leukocytosis and adverse hospital outcomes after acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology*. Aug 15 2003;92(4):368-372.
- [00219] 8. Takahashi et al., Relationship of admission neutrophil count to microvascular injury, left ventricular dilation, and long-term outcome in patients treated with primary angioplasty for acute myocardial infarction. *CircJ*. Jun 2008;72(6):867-872.
- [00220] 9. Gonon et al., Limitation of infarct size and attenuation of myeloperoxidase activity by an endothelin A receptor antagonist following ischaemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol*. Sep 2001;96(5):454-462.
- [00221] 10. Vasilyev et al., Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. *Circulation*. Nov 1 2005; 112(18):2812-2820.

- [00222] 11. Vinten-Johansen J., Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* Feb 15 2004;61(3):481-497.
- [00223] 12. Cheng et al., TH1/TH2 functional imbalance after acute myocardial infarction: coronary arterial inflammation or myocardial inflammation. *Journal of clinical immunology.* May 2005; 25(3):246- 253.
- [00224] 13. Kovacsovics-Bankowski et al., Clinical scale expanded adult pluripotent stem cells prevent graft-versus-host disease. *Cellular immunology.* 2009;255(1-2):55-60.
- [00225] 14. Van't Hof et al., Direct delivery of syngeneic and allogeneic large-scale expanded multipotent adult progenitor cells improves cardiac function after myocardial infarct. *Cytotherapy.* 2007;9(5):477-487.
- [00226] 15. Kovacsovics-Bankowski et al., Pre-clinical safety testing supporting clinical use of allogeneic multipotent adult progenitor cells. *Cytotherapy.* 2008;10(7):730-742.
- [00227] 16. Pelacho et al., Multipotent adult progenitor cell transplantation increases vascularity and improves left ventricular function after myocardial infarction. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine.* Jan-Feb 2007; 1 (1):51 -59.
- [00228] 17. Zeng et al., Bioenergetic and functional consequences of bone marrow derived multipotent progenitor cell transplantation in hearts with postinfarction LV remodeling. *Circulation.* 2007; In press.
- [00229] 18. Perry et al., Clinical Scale Expansion of Human Pluripotent Stem Cells. *ASH Annual Meeting Abstracts.* November 16, 2005 2005; 106(11): 1060-.
- [00230] 19. Vainerc et al., Serum Concentration and Chemotactic Activity of E-selectin (CD62E) in Inflammatory Bowel Disease. *Mediators of inflammation.* 1994; 3(3):215-218.
- [00231] 20. Zeitler et al., Elevated serum concentrations of soluble

- adhesion molecules in coronary artery disease and acute myocardial infarction. European journal of medical research. Sep 29 1997;2(9):389-394.
- [00232] 21. Lloyd-Jones et al., Heart Disease and Stroke Statistics-2010 Update. A Report From the American Heart Association. Circulation. Dec 17 2009.
- [00233] 22. Aranguren et al., Multipotent adult progenitor cells sustain function of ischemic limbs by stimulating vessel and muscle regeneration. 2007.
- [00234] 23. Wragg et al., VEGFR1/CXCR4 positive progenitor cells modulate local inflammation and augment tissue perfusion by a SDF1 dependent mechanism. The Journal of clinical investigation. 2006.
- [00235] 24. Hare et al., A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. Journal of the American College of Cardiology. Dec 8 2009;54(24):2277-2286.
- [00236] 25. Brenneman et al., Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats. J Cereb Blood Flow Metab. Jan;30(1): 140-149.
- [00237] 26. Halkos et al., Intravenous infusion of mesenchymal stem cells enhances regional perfusion and improves ventricular function in a porcine model of myocardial infarction. Basic Res Cardiol. Nov 2008; 103(6):525-536.
- [00238] 27. Tang et al., Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. Eur J Cardiothorac Surg. Aug 2006; 30(2):353- 361.
- [00239] 28. Ringden et al., Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. Transplantation. May 27 2006; 81 (10): 1390-1397.
- [00240] 29. Ringden et al., Mesenchymal stem cells combined with

cyclosporine inhibits cytotoxic T cells. Biol Blood Marrow Transplant. Jun 2006; 12(6):693-694.

[00241] 30. Highfill et al., Multipotent adult progenitor cells (MAPC) can suppress graft-versus-host disease via prostaglandin E2 synthesis and only if localized to sites of allopriming. Blood. May 20 2009.

### Exemplo 2

#### Aumento de potência para infra-regulação

[00242] O ensaio de célula endotelial tem sido usado para identificar um regime de tratamento de MultiStem que imita co-cultura de MultiStem com células endoteliais ativadas ou células-T ativadas. Previamente, os inventores haviam verificado que co-cultura de MultiStem com células endoteliais ativadas foi exigida para induzir a atividade antiinflamatória de MultiStem no ensaio de célula endotelial (infra-regulação de E-Selectina, ICAM e V-CAM). Em outras palavras, meio condicionado coletado de MultiStem crescida sob suas condições de cultura normais foi insuficiente para infra-regular moléculas de adesão em célula endotelial após ativação com TNF- $\alpha$  ou cytomix. Contudo, os inventores realizaram um experimento no qual trataram MultiStem por 3 dias com “cytomix” (uma mistura de 10 ng/ml de cada TNF- $\alpha$ , Interferon-gama e Interleucina 1 beta). Subsequentemente coletaram o meio condicionado de MultiStem após este tratamento. Este meio condicionado foi então usado para substituir MultiStem no ensaio de célula endotelial (foi adicionado nas células endoteliais ativadas quer com TNF- $\alpha$  quer com cytomix e cultivado por 2 ou 3 dias). Verificaram que diferentemente do meio basal não condicionado ou do meios coletado de MultiStem cultivado sob condições normais, este meio tratado com “cytomix” foi suficiente para prevenir a supra-regulação de molécula de adesão em célula endotelial. Este meio pôde substituir a co-cultura de MultiStem com as células endoteliais ativadas. Subsequentemente utilizaram este meio para testar se poderia substituir a co-cultura de MultiStem com célula-T no ensaio

de proliferação de célula-T e verificaram que foi suficiente para prevenir a proliferação de célula-T induzida por CD3/CD28, diferente de meio condicionado de MultiStem não tratadas.

[00243] Portanto, têm concluído que o tratamento de MultiStem com cytomix é suficiente para induzir a atividade antiinflamatória de MultiStem exigida para prevenir ativação de célula-T e supra-regulação de molécula de adesão em célula endotelial. Isto foi descoberto usando o ensaio de célula endotelial.

## REIVINDICAÇÕES

1. Uso de células progenitoras adultas multipotentes (MAPCs) com uma potência desejada para um ou mais dos seguintes: (1) reduzir extravasamento de leucócitos, (2) reduzir adesão de leucócitos em endotélio vascular ou em células endoteliais isoladas, (3) reduzir ativação de células endoteliais mediada por citocina, (4) reduzir expressão de uma ou mais moléculas de adesão celular sobre uma célula endotelial, caracterizado pelo fato de ser na preparação de um medicamento para tratamento de inflamação em um indivíduo, as MAPCs sendo caracterizadas por serem células não-embrionárias, não-germinativas que expressam um ou mais de oct4, telomerase, rex-1, ou rox-1 e/ou podem se diferenciar em tipos celulares de pelo menos duas das camadas germinativas endodermal, ectodermal, e mesodermal, em que antes da administração das MAPCs ao indivíduo, as MAPCs são avaliadas quanto a terem a potência desejada.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as células são alogênicas.

3. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é humano.

4. Método para obter células progenitoras adultas multipotentes (MAPCs) com uma potência desejada para um ou mais dos seguintes: (1) reduzir extravasamento de leucócitos, (2) reduzir adesão de leucócitos em endotélio vascular ou em células endoteliais isoladas, (3) reduzir ativação de células endoteliais mediada por citocina, (4) reduzir expressão de uma ou mais moléculas de adesão celular sobre uma célula endotelial, o dito método caracterizado pelo fato de compreender avaliar MAPCs para uma potência desejada para um ou mais dos efeitos de (1) - (4) acima, as MAPCs sendo caracterizadas por serem células não-embrionárias, não-germinativas que expressam um ou mais de oct4, telomerase, rex-1, ou rox-1 e/ou podem se diferenciar em tipos celulares de pelo menos duas das

camadas germinativas endodermal, ectodermal, e mesodermal.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 ou 5, caracterizados pelo fato de que a citocina é selecionada do grupo consistindo em TNF- $\alpha$  e IL-1.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 ou 5, caracterizados pelo fato de que a ativação mediada por citocina produz um aumento em expressão de uma ou mais de E-selectina, P-selectina, VCAM-1, ICAM, e VCAM-2 na célula endotelial.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 ou 5, caracterizado pelo fato de que a molécula de adesão celular, cuja expressão é reduzida na célula endotelial, é uma ou mais de E-selectina, P-selectina, VCAM-1, ICAM, e VCAM-2.

8. Método para aumentar a potência de células progenitoras adultas multipotentes (MAPCs) para efetuar um ou mais dos seguintes: 1) reduzir extravasamento de leucócitos, (2) reduzir adesão de leucócitos em endotélio vascular ou em células endoteliais isoladas, (3) reduzir ativação de células endoteliais mediada por citocina, (4) reduzir expressão de uma ou mais moléculas de adesão celular sobre uma célula endotelial; as MAPCs sendo células não-embrionárias, não-germinativas que expressam um ou mais de oct4, telomerase, rex-1, ou rox-1 e/ou podem se diferenciar em tipos celulares de pelo menos duas das camadas germinativas endodermal, ectodermal, e mesodermal, o método caracterizado pelo fato de compreender contatar as MAPCs com IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , e TNF- $\alpha$ .

9. Uso ou método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que as células expressam telomerase.

10. Uso ou método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que as células expressam Oct4.

11. Uso ou método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que as células expressam telomerase e Oct4.

12. Uso ou método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que as células podem se diferenciar em tipos celulares de pelo menos duas das camadas germinativas endodermal, ectodermal e mesodermal.

13. Uso ou método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que as células podem se diferenciar em tipos celulares das camadas germinativas endodermal, ectodermal e mesodermal.

14. Uso ou método de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, caracterizado pelo fato de que as células podem se diferenciar em tipos celulares de pelo menos duas das camadas germinativas endodermal, ectodermal e mesodermal.

15. Uso ou método de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 12, caracterizado pelo fato de que as células podem se diferenciar em tipos celulares de pelo menos duas das camadas germinativas endodermal, ectodermal e mesodermal.

16. Uso ou método de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 15, caracterizado pelo fato de que as células são células humanas.

17. Uso ou método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que as células são derivadas de medula óssea.