



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

**(21) BR 112013003366-5 A2**



\* B R 1 1 2 0 1 3 0 0 3 3 6 6 A 2 \*

**(22) Data do Depósito: 12/08/2011**

**(43) Data da Publicação Nacional: 04/08/2020**

**(54) Título: TERAPIA APERFEIÇOADA DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS E PROGENITORAS**

**(51) Int. Cl.: A61K 35/12; A61K 35/44; A61K 38/17; A61P 35/00.**

**(30) Prioridade Unionista: 12/08/2010 US 61/373,212.**

**(71) Depositante(es): FATE THERAPEUTICS, INC..**

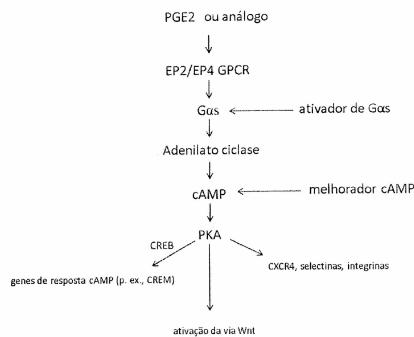
**(72) Inventor(es): DANIEL SHOEMAKER; PRATIK MULTANI; CAROLINE DESPONTS; DAVID L. ROBBINS; PAUL GRAYSON; JOHN MENDLEIN.**

**(86) Pedido PCT: PCT US2011047657 de 12/08/2011**

**(87) Publicação PCT: WO 2012/021845 de 16/02/2012**

**(85) Data da Fase Nacional: 13/02/2013**

**(57) Resumo:** TRONCO HEMATOPOIÉTICO APERFEIÇOADO E TERAPIA DE CÉLULA PROGENITORA. A invenção fornece métodos para terapia celular. Em particular, a invenção fornece composições terapêuticas de células tronco hematopoieticas e/ou progenitores modificadas contendo propriedades de enxerto e alojamento melhoradas, e métodos de preparação da composição terapêutica. A invenção ainda fornece métodos para melhorar a eficácia de transplante de célula tronco hematopoietica e progenitora incluindo transplantar a composição terapêutica aos sujeitos em necessidade de reconstituição do sistema hematopoietico.



*FIG. 1*

**"TERAPIA APERFEIÇOADA DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS E PROGENITORAS"**

**PEDIDOS RELACIONADOS**

Este pedido reivindica o benefício do 35 U.S.C. § 119(e) do Pedido Provisório de

- 5 Patente U.S. No. 61/373.212 depositado em 12 de agosto de 2010, que é aqui incorporado por referência na sua totalidade.

**FUNDAMENTO**

**Campo Técnico**

A presente invenção refere-se geralmente a terapia celular. Particularmente, a pre-

- 10 sente invenção refere-se a terapias com células aperfeiçoadas para o sistema hematopoiético. Mais particularmente, a presente invenção refere-se a métodos aperfeiçoados para re-constituir o sistema hematopoiético de um indivíduo.

**Descrição da Técnica Relacionada**

Medicina regenerativa é um campo de pesquisa médica no desenvolvimento de tra-

- 15 tamentos para reparar ou restaurar células específicas, tecidos e órgãos no corpo. Um aspecto da terapia regenerativa buscado é o uso de transplantes de células tronco hematopoiéticas para tratar uma lista crescente de cânceres e de distúrbios degenerativos. De acordo com o ® (NMDP), um número estimado de 45.000 a 50.000 transplantes de células hematopoiéticas (medula óssea, células tronco do sangue periférico (PBSC), ou transplantes 20 de sangue do cordão umbilical), incluindo aproximadamente 20.000 transplantes de células hematopoiéticas alogênicas, são realizados anualmente em todo o mundo para tratar pacientes com doenças fatais malignas e não malignas (Horowitz MM. *Uses and Growth of Hematopoietic Cell Transplantation*. Em: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR, eds. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. 3rd ed. Malden, Mass: Blackwell; 2004:9-15). Além 25 disso, cerca de 4.800 pacientes são transplantados anualmente utilizando doadores não relacionados ou unidades de sangue do cordão umbilical por meio do NMDP.

Desde que iniciou suas atividades em 1987, o NMDP facilitou mais de 38.000 transplantes de medula e de sangue do cordão umbilical para dar aos pacientes uma segunda chance na vida. Tradicionalmente, os transplantes de células tronco hematopoiéticas 30 da medula óssea foram utilizados para tratar pacientes que sofriam de vários tipos de leucemias, anemias, linfomas, mielomas, distúrbios de deficiência imune, e tumores sólidos, por exemplo, câncer de mama e ovariano. No entanto, o transplante de medula óssea é doloroso para doadores e, além disso, é muitas vezes difícil e demorado encontrar o grau requerido de compatibilidade de HLA do tecido doador, especialmente em determinadas populações étnicas. Além disso, os transplantes de medula óssea alogênica são frequentemente 35 associados com uma incidência significativa de doença enxerto-hospedeiro (GVHD).

poiéticas têm câncer avançado ou outras doenças metabólicas, que são fatais. Assim, quaisquer atrasos em encontrar um doador contendo um tipo de tecido HLA compatível apropriado podem comprometer o resultado do paciente, muitas vezes resultando em fatalidade. Assim, o recente crescimento no número de transplantes de doadores não relacionados do NMDP tem sido especialmente dramático, com mais de 4.800 transplantes só em 2009, em comparação com 4.300 em 2008. Além disso, a proporção de transplantes alogênicos usando doadores não relacionados ou unidades de sangue do cordão umbilical tem aumentado constantemente. Em 2006, mais de um terço dos transplantes alogênicos realizados mundialmente utilizaram doadores não relacionados. Em 2009, 75% dos doadores adultos – mais de 2.800 – doaram PBSC aos pacientes através do NMDP. Em 2009, 1.056 transplantes de sangue do cordão umbilical foram facilitados pelo NMDP, que representa 22% do número total de transplantes do NMDP em 2009. Este é um aumento de 18% desde 2008, quando o NMDP facilitou 898 transplantes de sangue do cordão umbilical.

Os transplantes de células tronco hematopoiéticas alogênicas foram realizados utilizando sangue do cordão umbilical, porque o sangue é mais facilmente obtido, carrega um risco mais baixo para o receptor da doença enxerto-hospedeiro, é indolor para o doador e requer menos da compatibilidade de HLA do tipo de tecido entre doador e receptor.

No entanto, várias desvantagens são percebidas na utilização de transplantes do sangue do cordão umbilical humano, incluindo o risco de que células tronco hematopoiéticas e progenitoras do transplante de sangue do cordão umbilical não enxertem.

Outra desvantagem da utilização de transplantes de sangue do cordão umbilical é que leva mais tempo para as células do sangue do cordão umbilical para se enxertarem no paciente, o que coloca o paciente em alto risco de infecção. Além disso, transplantes de sangue do cordão umbilical são uma nova abordagem de tratamento. Assim, os médicos podem ser desencorajados a usá-los porque eles não têm tanta informação sobre resultados em longo prazo dos pacientes após transplantes de sangue do cordão umbilical, como têm para transplantes de medula. Além disso, transplantes de sangue do cordão umbilical também têm todos os mesmos riscos dos transplantes de medula e sangue periférico.

Além disso, uma barreira significativa para a utilização do sangue do cordão umbilical como fonte de células para transplantes de sangue humano é que muitas vezes não há células formadoras de sangue suficientes em uma única unidade de sangue do cordão umbilical para o tamanho do paciente ou para tratar a indicação específica. Devido ao fato de que o tamanho de um único cordão umbilical (ou seja, o número de células formadoras de sangue em um único cordão umbilical) é muitas vezes insuficiente para um transplante de sangue, dois cordões podem ser solicitados, aumentando os riscos de GVHD e falha em enxertar. Assim, várias abordagens foram experimentadas para expandir o número de células tronco hematopoiéticas e progenitoras no sangue do cordão umbilical dentro de enxertos

isolados em ambientes *ex vivo*, que podem permitir o transplante usando um único cordão umbilical, mas estes esforços tiveram sucesso limitado.

Assim, a promessa de terapias restaurativas ou regenerativas de células tronco hematopoiéticas não foi realizada, em parte, devido a dificuldades na tradução de protocolos 5 de modelos animais promissores na prática clínica humana, baixa eficácia dos protocolos clínicos existentes, alta incidência de complicações, por exemplo, doença do enxerto-hospedeiro, e relativamente poucos doadores suficientemente compatíveis.

Assim, existe uma necessidade na técnica por métodos que podem aumentar a eficiência do enxerto de célula tronco hematopoiética e progenitora para a medula óssea, a fim 10 de ampliar a aplicabilidade e aumentar o sucesso do transplante de células tronco hematopoiéticas. A presente invenção fornece soluções para estes problemas e ainda fornece outros usos e vantagens que serão evidentes para especialistas na técnica.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção fornece métodos aperfeiçoados de transplante de células tronco hematopoiéticas e progenitoras. Além disso, a invenção fornece uma preparação superior de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras que têm potencial aumentado de enxerto e/ou expansão aumentada. Em várias modalidades, as células são expandidas ou proliferadas *in vivo*. Em várias outras modalidades, as células são tratadas *ex vivo*, administradas a um sujeito e expandidas ou proliferadas *in vivo*.

20 Em um aspecto, a invenção fornece composição terapêutica compreendendo a população de células contendo pelo menos cerca de um milhão de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras humanas, em que a) as células tronco hematopoiéticas ou progenitoras foram contatadas *ex vivo* em uma temperatura de cerca de 37°C com um agente que aumenta expressão de gene CXCR4 nas células; b) a expressão de gene de CXCR4 é aumentada nas células tronco hematopoiéticas ou progenitoras em pelo menos cerca de 25 2 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada; e c) em que a composição terapêutica compreende uma suspensão farmaceuticamente aceitável, estéril de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras prontas para administração a um paciente.

30 Em uma modalidade particular, a expressão de gene de CXCR4 nas células tronco hematopoiéticas ou progenitoras de uma composição terapêutica é aumentada em pelo menos cerca de 3 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada.

35 Em uma modalidade, a população de células compreende uma coleção de Células CD34<sup>+</sup> em que a expressão de gene de CXCR4 na coleção de Células CD34<sup>+</sup> é aumentada em pelo menos cerca de 3 vezes comparada a uma coleção não contatada de Células CD34<sup>+</sup>.

Em outra modalidade, a expressão de gene de CXCR4 é aumentada em cerca de 3 vezes a cerca de 8 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoietica ou progenitora não contatada.

5 Ainda em outra modalidade da composição terapêutica, a expressão de gene de CXCR4 é aumentada em pelo menos cerca de 4 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoietica ou progenitora não contatada.

10 Ainda em outra modalidade da composição terapêutica, a expressão de gene de CXCR4 é aumentada em pelo menos cerca de 6 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoietica ou progenitora não contatada. Ainda em outra modalidade da composição terapêutica, a expressão de gene de CXCR4 é aumentada em pelo menos cerca de 7 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoietica ou progenitora não contatada.

15 Em outra modalidade da composição terapêutica, a expressão de gene de CXCR4 é aumentada em pelo menos cerca de 8 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoietica ou progenitora não contatada. Ainda em outra modalidade da composição terapêutica, a expressão de gene de CXCR4 é aumentada em pelo menos cerca de 10 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoietica ou progenitora não contatada.

20 Ainda em outra modalidade da invenção, a expressão de gene de CXCR4 é aumentada em pelo menos cerca de 12 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoietica ou progenitora não contatada.

Em uma modalidade adicional da invenção, a expressão de gene de CXCR4 é aumentada em pelo menos cerca de 16 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoietica ou progenitora não contatada.

25 Em algumas modalidades, a expressão de gene de CXCR4 nas células tronco hematopoieticas ou progenitoras de uma composição terapêutica é aumentada em cerca de 8 a cerca de 18 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoietica ou progenitora não contatada .

30 Em várias modalidades da invenção, o agente que aumenta a expressão de gene CXCR4 nas células tronco hematopoieticas ou progenitoras é selecionado do grupo que consiste de um melhorador cAMP, um ativador G $\alpha$ -s, e um composto que seletivamente liga o receptor PGE<sub>2</sub> EP<sub>4</sub>.

35 Em modalidades particulares, o agente que aumenta a expressão de gene CXCR4 nas células tronco hematopoieticas ou progenitoras é PGE<sub>2</sub>, ou um análogo ou derivado de PGE<sub>2</sub>. Em modalidades mais particulares, o agente que aumenta a expressão de gene CXCR4 nas células tronco hematopoieticas ou progenitoras é 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>.

Em uma modalidade de uma composição terapêutica da invenção, as células tronco

hematopoiéticas ou progenitoras foram contatadas com o agente por um tempo de pelo menos cerca de uma hora. Em várias modalidades, as células tronco hematopoiéticas ou progenitoras foram contatadas com o agente por um tempo de cerca de uma hora a cerca de seis horas. Em modalidades particulares, as células tronco hematopoiéticas ou progenitoras foram contatadas com o agente por um tempo de cerca de duas horas a cerca de seis horas. Em modalidades mais particulares, as células tronco hematopoiéticas ou progenitoras compreendendo a composição terapêutica foram contatadas com o agente por um tempo de cerca de duas horas.

Em modalidades particulares da invenção, as células tronco hematopoiéticas ou progenitoras compreendendo a composição terapêutica compreendem uma assinatura de expressão de gene em que a expressão de um ou mais genes de assinatura é aumentada em pelo menos cerca de 2 vezes comparada à expressão do um ou mais genes de assinatura em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada em que o gene de assinatura é selecionado do grupo que consiste de: hialuronan sintase 1 (HAS1), proteína GEM de ligação a GTP (GEM), proteína fosfatase 4 de especificidade dual (DUSP4), anfíregulina (AREG), Proteína 1 relacionada a receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento responsivo de cAMP (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), e antígeno 2 relacionado a Fos (FOSL2).

Em modalidades mais particulares, a expressão de pelo menos dois dos genes de assinatura é aumentada em pelo menos 5, 10, 15, ou 20 vezes comparada à expressão dos dois genes de assinatura em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada. Em modalidades mais particulares, a expressão de cada um dos genes de assinatura é aumentada em pelo menos cerca de 2 vezes comparada à expressão dos genes de assinatura em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada .

Em várias modalidades, a população de células compreendendo a composição terapêutica compreende menos do cerca de .10,.50, 1.0, 3, 5, 10, 15, 20, ou 30% de Células CD34<sup>+</sup>. Em algumas modalidades, a população de células compreende pelo menos cerca de .01% e não mais do que cerca de 50% de Células CD34<sup>+</sup>.

Em algumas modalidades, a população de células não é expandida *ex vivo*.  
 Em várias modalidades, a composição terapêutica é gerada em um ponto de cuidado e é administrada em um paciente sem cultivar a população de células. Em algumas modalidades, a composição terapêutica é gerada dentro de 24 horas da administração da composição para o paciente. Em algumas modalidades, a composição terapêutica é gerada dentro de 24 horas da administração da composição para o paciente. Em algumas modalidades, a composição terapêutica é gerada dentro de 6 horas da administração da composição para o paciente. Em algumas modalidades, a composição terapêutica é gerada no dia da infusão da composição.

Em algumas modalidades, a composição terapêutica é substancialmente isenta do agente. Em várias modalidades, a composição terapêutica compreende células tronco hematopoieticas ou progenitoras suspensas em uma solução de 5% de albumina sérica humana e dextrano.

5 Em algumas modalidades, a composição terapêutica compreende menos do que cerca de 30%, 25%, 20%, 15%, 10% ou 5% de células tronco mesenquimais. Em modalidades particulares, a composição terapêutica compreende não mais do que cerca de 10% de células tronco mesenquimais.

10 Em algumas modalidades, a composição terapêutica compreende menos do que cerca de 30%, 25%, 20%, 15%, 10% ou 5% de células progenitoras endoteliais. Em modalidades particulares, a composição terapêutica compreende não mais do que cerca de 10% de células progenitoras endoteliais.

15 Em modalidades particulares da invenção, a população de células compreende células positivas para o marcador de superfície celular CD34, e compreende menos do que cerca de 30%, 25%, 20%, 15%, 10% ou 5% de células positivas para um marcador de superfície celular selecionado do grupo que consiste de CD73, CD140B, CD14 e VWF.

20 Em modalidades particulares, a população de células compreendendo a composição terapêutica da invenção compreende Células CD34<sup>+</sup> e compreende menos do que cerca de 30%, 25%, 20%, 15%, 10% ou 5% de células CD14<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>. Em modalidades particulares da invenção, a população de células compreende Células CD34<sup>+</sup> e compreende menos do que cerca de 30%, 25%, 20%, 15%, 10% ou 5% de células VWF<sup>+</sup>. Em outras modalidades da invenção, a população de células compreende Células CD34<sup>+</sup> e compreende menos do que cerca de 30%, 25%, 20%, 15%, 10% ou 5% de células CD140B<sup>+</sup>.

25 Em modalidades mais particulares, a população de células compreende células tronco hematopoieticas ou progenitoras CD34<sup>+</sup> e compreende menos do que cerca de 30%, 25%, 20%, 15%, 10% ou 5% de células CD14<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, células VWF<sup>+</sup>, células CD73<sup>+</sup> e células CD140B<sup>+</sup>. Em algumas modalidades, a população de células é positiva para o marcador de superfície celular CD34 e é negativa para pelo menos um marcador de superfície celular do grupo que consiste de CD14, VWF, CD73 e CD140B. Em outras modalidades, a população de células é positiva para o marcador de superfície celular CD34 e é negativa para os marcadores de superfície celular CD14, VWF, CD73 e CD140B.

30 Em várias modalidades da invenção, pelo menos cerca de 15% das células dentro de uma população de células expressam a proteína CXCR4.

35 Em algumas modalidades, a população de células é obtida de medula óssea, sangue de cordão umbilical, ou sangue periférico mobilizado.

Em modalidades particulares, a população de células é HLA haplotipado. Em modalidades mais particulares, a população de células é HLA haplotipada baseado no grupo que

- consiste de HLA-A, HLA-B, HLA-C, e HLA-DRB1. Em algumas modalidades, a população de células HLA haplotipadas é compatível com um sujeito humano específico. Em algumas modalidades, a população de células HLA haplotipadas tem 4 de 6 HLA compatíveis com um sujeito humano específico.
- 5 Em outra modalidade, a invenção fornece composição terapêutica compreendendo uma população de células comprendendo pelo menos cerca de um milhão de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras humanas em que a) as células tronco hematopoiéticas ou progenitoras foram contatadas *ex vivo* em uma temperatura de cerca de 37°C com 16,16-dmPGE<sub>2</sub> por um tempo de cerca de duas horas; b) as células tronco hematopoiéticas ou 10 progenitoras compreendem uma coleção de Células CD34<sup>+</sup> em que a expressão de gene de CXCR4 é aumentada na coleção de Células CD34<sup>+</sup> em pelo menos cerca de 3 vezes comparada à expressão de CXCR4 em células CD34<sup>+</sup> não contatadas; c) em que a composição terapêutica compreende uma suspensão farmaceuticamente aceitável, estéril de células tronco hematopoiética ou progenitoras prontas para administração a um paciente.
- 15 Em algumas modalidades, a população de células compreende uma coleção de Células CD34<sup>+</sup> em que a expressão de gene de CXCR4 na coleção de Células CD34<sup>+</sup> é aumentada em pelo menos cerca de 3 vezes comparada a uma coleção não contatada de Células CD34<sup>+</sup>.
- Em várias modalidades, a expressão de gene de CXCR4 é aumentada em cerca de 20 3 vezes a cerca de 8 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada. Em modalidades mais particulares, a expressão de gene de CXCR4 é aumentada em pelo menos cerca de 4 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada.
- Em outras modalidades particulares, a expressão de gene de CXCR4 é aumentada 25 em pelo menos cerca de 6 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada. Em outras modalidades particulares, a expressão de gene de CXCR4 é aumentada em pelo menos cerca de 7 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada.
- Em outras modalidades, a expressão de gene de CXCR4 é aumentada em pelo menos 30 cerca de 8 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada. Em outras modalidades, a expressão de gene de CXCR4 é aumentada em pelo menos cerca de 10 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada. Em outras modalidades, a expressão de gene de CXCR4 é aumentada em pelo menos cerca de 12 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada.
- Em outras modalidades, a expressão de gene de CXCR4 é aumentada em pelo menos 35 cerca de 16 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoiética ou

progenitora não contatada. Em outras modalidades, a expressão de gene de CXCR4 é aumentada em cerca de 8 vezes a cerca de 18 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada.

Em algumas modalidades, as células tronco hematopoiéticas ou progenitoras com 5 preendem uma assinatura de expressão de gene em que a expressão de um ou mais genes de assinatura é aumentada em pelo menos cerca de 2 vezes comparada à expressão de um ou mais genes de assinatura em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada, em que o gene de assinatura é selecionado do grupo que consiste de: hialuronan sintase 1 (HAS1), proteína GEM de ligação a GTP (GEM), proteína fosfatase 4 de especificidade dual (DUSP4), anfiregulina (AREG), Proteína 1 relacionada a receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento responsivo de cAMP (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), e antígeno 2 relacionado a Fos (FOSL2).

Em outras modalidades, a expressão de pelo menos dois dos genes de assinatura é aumentada em pelo menos 5, 10, 15, ou 20 vezes comparada à expressão dos dois genes 10 de assinatura em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada.

Em uma modalidade particular, a expressão de cada um dos genes de assinatura é aumentada em pelo menos cerca de 2 vezes comparada à expressão dos genes de assinatura em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada .

Em outras modalidades, a população de células não comprehende mais do que cerca de .10,.50, 1.0, 3, 5, 10, 15, 20, ou 30% de Células CD34<sup>+</sup>. Em modalidades mais particulares, a população de células comprehende pelo menos cerca de .01% e não mais do que cerca de 50% de Células CD34<sup>+</sup>.

Em várias modalidades, a população de células não é expandida *ex vivo*.  
Em modalidades particulares, a população de células é obtida de medula óssea, 25 sangue de cordão umbilical, ou sangue periférico mobilizado.

Em algumas modalidades, a população de células é HLA haplotipado.  
Em outra modalidade, a invenção fornece composição terapêutica comprehendendo a população de células haplotipadas contendo pelo menos cerca de um milhão de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras humanas, em que a) as células tronco hematopoiéticas ou progenitoras foram contatadas *ex vivo* em uma temperatura de cerca de 37°C com um agente que aumenta a expressão de gene CXCR4 nas células; b) a expressão de gene de CXCR4 é aumentada nas células tronco hematopoiéticas ou progenitoras em pelo menos cerca de 2 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada; e c) em que a composição terapêutica comprehende uma suspensão farmaceuticamente aceitável, estéril de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras prontas para administração a um paciente.

Em uma modalidade particular, a população de células haplotipadas é haplotipada

baseado no grupo que consiste de HLA-A, HLA-B, HLA-C, e HLA-DRB1. Em modalidades mais particulares, a população de células haplotipadas é haplotipada baseada no grupo que consiste de HLA-DRB3/4/5, HLA-DQB1, e DPB1. Em algumas modalidades, a população de células haplotipadas é compatível com um sujeito humano específico. Em várias modalidades, a população de células HLA haplotipadas tem 4 de 6 HLA compatíveis com um sujeito humano específico.

- 5 Em algumas modalidades, a expressão de gene de CXCR4 nas células tronco hematopoieticas ou progenitoras é aumentada em pelo menos cerca de 3 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoietica ou progenitora não contatada.
- 10 10 Em modalidades particulares, a expressão de gene de CXCR4 é aumentada em cerca de 3 vezes a cerca de 8 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoietica ou progenitora não contatada. Em outras modalidades particulares, a expressão de gene de CXCR4 é aumentada em pelo menos cerca de 4 vezes comparada à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoietica ou progenitora não contatada.
- 15 15 Em modalidades particulares, o agente que aumenta a expressão de gene CXCR4 nas células tronco hematopoieticas ou progenitoras é selecionado do grupo que consiste de um análogo de cAMP ou melhorador, um ativador Ga-s, e um composto que seletivamente liga o receptor PGE<sub>2</sub> EP4. Em modalidades mais particulares, o agente que aumenta a expressão de gene CXCR4 nas células tronco hematopoieticas ou progenitoras é 16,16-dimetil 20 PGE<sub>2</sub>.

Em várias modalidades, as células tronco hematopoieticas ou progenitoras foram contatadas com o agente por um tempo de cerca de uma hora a cerca de seis horas.

- 25 Em algumas modalidades, as células tronco hematopoieticas ou progenitoras comprehendem uma assinatura de expressão de gene em que a expressão de um ou mais genes de assinatura é aumentada em pelo menos cerca de 2 vezes comparada à expressão de um ou mais genes de assinatura em uma célula tronco hematopoietica ou progenitora não contatada, em que o gene de assinatura é selecionado do grupo que consiste de: hialuronan sintase 1 (HAS1), proteína GEM de ligação a GTP (GEM), proteína fosfatase 4 de especificidade dual (DUSP4), anfiregulina (AREG), Proteína 1 relacionada a receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento responsivo de cAMP (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), e antígeno 2 relacionado a Fos (FOSL2).

- 30 30 Em modalidades particulares, a expressão de pelo menos dois dos genes de assinatura é aumentada em pelo menos 5, 10, 15, ou 20 vezes comparada à expressão dos dois genes de assinatura em uma célula tronco hematopoietica ou progenitora não contatada.
- 35 35 Em outras modalidades, a expressão de cada um dos genes de assinatura é aumentada em pelo menos cerca de 2 vezes comparada à expressão dos genes de assinatura em uma célula tronco hematopoietica ou progenitora não contatada . Em outras modalida-

des, a expressão de cada um dos genes de assinatura é aumentada em pelo menos cerca de 4 vezes comparada à expressão dos genes de assinatura em uma célula tronco hematopoética ou progenitora não contatada. Em outras modalidades, a expressão de cada um dos genes de assinatura é aumentada em pelo menos cerca de 6 vezes comparada à expressão dos genes de assinatura em uma célula tronco hematopoética ou progenitora não contatada.

Ainda em outras modalidades, a população de células compreende menos do que cerca de .10,.50, 1.0, 3, 5, 10, 15, 20, ou 30% de Células CD34<sup>+</sup>.

Em modalidades mais particulares, a população de células compreende pelo menos cerca de .01% e não mais do que cerca de 50% de Células CD34<sup>+</sup>.

Em algumas modalidades, a população de células não é expandida *ex vivo*.

Em outras modalidades, a composição terapêutica é gerada em um ponto de cuidado e é administrada em um paciente sem cultivar a população de células. Em algumas modalidades, a composição terapêutica é gerada em menos do que cerca de 24 horas antes de administrar a composição para o paciente. Em algumas modalidades, a composição terapêutica é gerada em menos do que cerca de 12 horas antes de administrar a composição para o paciente. Em algumas modalidades, a composição terapêutica é gerada em menos do que cerca de 6 horas antes de administrar a composição para o paciente. Em algumas modalidades, a composição terapêutica é gerada no dia da infusão da composição.

Em outras modalidades, a população de células compreendendo a composição terapêutica é obtida de medula óssea, sangue de cordão umbilical, ou sangue periférico mobilitado.

Em outra modalidade, a invenção contempla, em parte, um método para preparar composição terapêutica para utilização em transplante de células tronco hematopoéticas ou progenitoras compreendendo: contatar a população de células compreendendo células tronco hematopoéticas ou progenitoras, *ex vivo* ou *in vitro*, em uma temperatura de cerca de 37°C, em condições suficientes para modificar a expressão de gene das células tronco hematopoéticas ou progenitoras para resultar em células tronco hematopoéticas ou progenitoras compreendendo uma assinatura de expressão de gene compreendendo expressão aumentada, comparado a células tronco hematopoéticas ou progenitoras não contatadas, de um ou mais dos seguintes genes: hialuronan sintase 1 (HAS1), proteína GEM de ligação a GTP (GEM), proteína fosfatase 4 de especificidade dual (DUSP4), anfiregulina (AREG), Proteína 1 relacionada a receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento responsável de cAMP (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), antígeno 2 relacionado a Fos (FOSL2), ou receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4).

Em outra modalidade, a invenção contempla, em parte, um método para aumentar o enxerto de células tronco hematopoéticas ou progenitoras em um sujeito compreendendo:

contatar uma população de células que compreende células tronco hematopoiéticas ou progenitoras *ex vivo* em uma temperatura de cerca de 37 °C com um ou mais agentes selecionados do grupo que consiste de PGE<sub>2</sub> e um agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub>; lavar a população de células para remover substancialmente o agente; e administrar a população de células contatadas a um sujeito; em que a população de células é contatada com o agente em condições suficientes para aumentar o enxerto das células tronco hematopoiéticas progenitoras contatadas no sujeito comparado às células tronco hematopoiéticas ou progenitoras não contatadas.

Em uma modalidade, a invenção contempla, em parte, um método para tratar um sujeito em necessidade de reconstituição de sistema hematopoiético compreendendo: selecionar um sujeito em necessidade de reconstituição hematopoiética; contatar a população de células que compreende células tronco hematopoiéticas ou progenitoras *ex vivo* em uma temperatura de cerca de 37°C com um ou mais agentes selecionados do grupo que consiste de PGE<sub>2</sub> e um agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub>; lavar a população de células para substancialmente remover o agente; e administrar a população de células contatadas ao sujeito; em que a população de células é contatada com o agente em condições suficientes para aumentar o enxerto das células tronco hematopoiéticas progenitoras contatadas no sujeito comparado às células tronco hematopoiéticas ou progenitoras não contatadas.

Em uma modalidade adicional, a invenção contempla, em parte, um método de tratamento de um sujeito em necessidade de reconstituição de sistema hematopoiético compreendendo: selecionar o sujeito em necessidade de reconstituição hematopoiética; contatar a população de células que compreende células tronco hematopoiéticas e progenitoras em uma temperatura de cerca de 37°C com um ou mais agentes selecionados do grupo que consiste de: uma prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) ou um agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub>; lavar a população de células para remover substancialmente o agente; e administrar a população de células contatadas ao sujeito; em que a população de células é contatada com o agente em condições suficientes para aumentar o enxerto das células tronco hematopoiéticas e progenitoras contatadas no sujeito em comparação a células tronco hematopoiéticas e progenitoras não contatadas, assim tratando o sujeito em necessidade de reconstituição do sistema hematopoiético.

Em uma outra modalidade, a invenção contempla, em parte, um método para preparar a população de células para aumentar expansão de célula tronco hematopoiética e progenitora *in vivo* compreendendo: contatar a população de células compreendendo células tronco hematopoiéticas ou progenitoras, *ex vivo* ou *in vitro*, em uma temperatura de cerca de 37°C, com um ou mais agentes selecionados do grupo que consiste de: uma prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) ou um agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub>; em que a população de células é contatada com o agente em condições suficientes para aumentar a expansão de célu-

las tronco hematopoiéticas ou progenitoras contatadas *in vivo* comparado às células tronco hematopoiéticas ou progenitoras não contatadas.

Em modalidades particulares dos métodos da invenção, a população de células é obtida de medula óssea, sangue de cordão umbilical, ou sangue periférico mobilizado.

5 Em outras modalidades particulares da invenção, o agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub> é dmPGE<sub>2</sub>, um análogo de cAMP ou melhorador, ou um ativador Ga-s.

Em certas modalidades, o agente é PGE<sub>2</sub> ou um análogo do mesmo.

Em certas modalidades particulares, o análogo PGE<sub>2</sub> é 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>.

Em outras modalidades particulares, o agente é um melhorador cAMP.

10 Em certas modalidades da invenção, as condições suficientes para modificar a expressão de gene de, aumentar o enxerto ou o potencial de enxerto de, ou aumentar a expansão da população de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras contatadas compreendem contatar a população de células com um ou mais agentes por um tempo de cerca de 1 hora a cerca de 6 horas, em que pelo menos um dos agentes compreende um agente

15 que aumenta a sinalização PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub> ou PGE<sub>2</sub>R4 nas células tronco hematopoiéticas ou progenitoras. Em certas modalidades, as células tronco hematopoiéticas ou progenitoras são contatadas em uma temperatura de cerca de 37°C por um tempo de cerca de 2 horas com uma concentração de cerca de 10 µM do agente que aumenta a sinalização PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub> ou PGE<sub>2</sub>R4 nas células tronco hematopoiéticas ou progenitoras.

20 Em outras modalidades, a população de células hematopoiéticas ou progenitoras é contatada com uma concentração de cerca de 10 µM ou mais 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> e por um tempo de cerca de 1 hora a cerca de 6 horas.

Em modalidades adicionais, a população de células é contatada com uma concentração de cerca de 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> e por um tempo de cerca de 2 horas.

25 Em modalidades particulares, o aumento no potencial de enxerto de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras contatadas na população de células compreende um aumento na expressão de gene de um ou mais de hialuronan sintase 1 (HAS1), proteína GEM de ligação a GTP (GEM), proteína fosfatase 4 de especificidade dual (DUSP4), anfiregulina (AREG), Proteína 1 relacionada a receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de

30 elemento responsivo de cAMP (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), antígeno 2 relacionado a Fos (FOSL2), ou receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4) comparado às células tronco hematopoiéticas ou progenitoras não contatadas, um aumento na capacidade de auto-renovação comparado às células tronco hematopoiéticas ou progenitoras não contatadas, e nenhuma diminuição substancial na viabilidade celular comparada às células tronco hematopoiéticas ou progenitoras não contatadas.

35 Em algumas modalidades da invenção, a população de células compreendendo células tronco hematopoiéticas ou progenitoras é preparada em um vaso isento de endotoxina

compreendendo a temperatura indicando dispositivo compreendendo pelo menos um indicador de temperatura que produz um sinal que indica a temperatura do vaso e um tempo decorrido indicando dispositivo que compreende pelo menos um indicador de tempo decorrido; e em que o vaso é apropriado para armazenamento de célula, tratamento de células, 5 lavagem de células, e infusão de célula.

Em certas modalidades da invenção, incluindo aqueles métodos da invenção para a preparação de uma população de células para um transplante de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras, e para a preparação de uma população de células para aumentar a expansão de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras, a população de células contada é administrada a um sujeito em necessidade do mesmo, como um sujeito em necessidade de terapia celular, e o método da invenção ainda compreende administrar a população de células contada a um sujeito em necessidade do mesmo.

Em certas modalidades particulares, o sujeito tem leucemia mieloide aguda (AML), leucemina linfoblástica aguda (ALL), leucemina mieloide crônica (CML), leucemina linfocítica crônica (CLL), leucemina mielomonocítica juvenil, Linfoma de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, mieloma múltiplo, anemia aplástica grave, Anemia de Fanconi, hemoglobinuria noturna paroxismal (PNH), aplasia de célula vermelha pura, amegacariocitose/trombocitopenia congênita, síndrome de imunodeficiência combinada grave (SCID), Síndrome de Wiskott-Aldrich, beta-talassemia principal, doença de célula pilosa, Síndrome de Hurler, adrenoleucodistrofia, 10 leucodistrofia metacromática, mielodisplasia, anemia refratária, leucemia mielomonocítica crônica, metaplasia mieloide agnogênica, linfohistiocitose eritrogagocítico familiar, tumores sólidos, doença granulomatosa crônica, mucopolisaccharidoses, ou Diamond-Blackfan.

Em certas outras modalidades particulares, o sujeito tem câncer de mama, câncer ovariano, câncer cerebral, câncer de próstata, câncer pulmonar, câncer de cólon, câncer de pele, câncer hepático, câncer pancreático, ou sarcoma.

Em outras certas modalidades, o sujeito tem medula óssea ablativa ou quimioterapia não mieolablativa ou radioterapia.

Em outras modalidades, o sujeito é um doador de medula óssea.

Em modalidades particulares, a população de células compreende uma ou mais 30 unidades de sangue de cordão. Em certas modalidades, o sujeito é administrado com uma ou mais unidades de sangue de cordão. Em outras modalidades, o sujeito é administrada com uma unidade de sangue de cordão parcial. Em outras modalidades particulares, o sujeito é administrado com uma unidade de sangue de cordão.

Em outras modalidades, a população de células compreendendo células tronco hematopoiéticas ou progenitoras é autogênica ao sujeito.

Em certas modalidades, a população de células é mobilizada do sangue periférico ou medula óssea do sujeito.

Em outras modalidades, a população de células compreendendo células tronco hematopoieticas ou progenitoras é alogênica ao sujeito.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS VÁRIOS PONTOS DE VISTA DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra uma representação diagramática do receptor<sub>2</sub> da prostaglandina E<sub>2</sub> /receptor acoplado a proteína 4G na via de sinalização celular presente em células tronco hematopoieticas e progenitoras.

A Figura 2 mostra um fluxograma experimental para a análise das populações purificadas de Células CD34<sup>+</sup> ou sangue de cordão umbilical humano tratados com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> sob diferentes conjuntos de condições experimentais.

10 A Figura 3 mostra os resultados para testes de cAMP em Células CD34<sup>+</sup> tratadas com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> sob diferentes conjuntos de condições experimentais.

15 A Figura 4 mostra um gráfico de dispersão dos dados da expressão Células CD34<sup>+</sup> tratadas com veículo no eixo x versus dados da expressão de genes de Células CD34<sup>+</sup> tratadas com 10  $\mu$ M de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> no eixo y. Note-se o aumento de 8 vezes em expressão de CREM e o aumento de 18 vezes na expressão CXCR4 em Células CD34<sup>+</sup> tratadas com 10  $\mu$ M de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> em relação às células tratadas com veículo.

A Figura 5 mostra um fluxograma experimental para a análise do tempo de tratamento na expressão de gene de Células CD34<sup>+</sup> tratadas com 10  $\mu$ M de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>.

20 A Figura 6 mostra os perfis de expressão de gene de Células CD34<sup>+</sup> tratadas com 10  $\mu$ M de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> (eixo y) contra células tratadas com veículo (eixo x) para os tempos de tratamento de 5, 15, 30, 60, e 120 minutos. Perfis de expressão de gene foram obtidos após o período de incubação de 120 minutos.

25 A Figura 7 mostra os perfis de expressão de gene de Células CD34<sup>+</sup> tratadas em 37°C durante 120 minutos com 100 nM, 1  $\mu$ M,  $\mu$ M 10 ou 100  $\mu$ M 16,16-dimetil PGE2 (eixo y) contra células tratadas com veículo (eixo x).

A Figura 8 mostra os perfis de expressão de gene de Células CD34<sup>+</sup> purificadas do sangue de cordão que foram tratadas em 37°C durante 120 minutos com 100 nM, 1  $\mu$ M,  $\mu$ M 10 ou 100  $\mu$ M 16,16-dimetil PGE2 (eixo y) contra células tratadas com veículo (eixo x).

30 A Figura 9 mostra os perfis de expressão de gene de Células CD34<sup>+</sup> tratadas com 10  $\mu$ M de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> por 60 minutos (painéis superiores) ou 120 minutos (painéis inferiores) e tratadas em 37°C (painéis esquerdos) ou 4°C (painel superior direito) ou 25°C (painel inferior direito) (eixo y) contra células tratadas com veículo (eixo x).

35 A Figura 10 mostra que Células CD34<sup>+</sup> incubadas com 10  $\mu$ M de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> durante 120 minutos a 37°C não diminuem a viabilidade celular em relação às células tratadas com veículo ou células tratadas com 10  $\mu$ M de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> por 120 minutos a 4°C.

A Figura 11 mostra que Células CD34<sup>+</sup> incubadas com 10  $\mu$ M de 16,16-dimetil

PGE<sub>2</sub> durante 120 minutos a 37°C não diminui em a capacidade das células de formarem unidades formadoras de colônias em comparação às células tratadas com veículo ou células tratadas com 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> por 120 minutos a 4°C. Unidade formadora de colônia de granulócito-monócito (CFU-GM); Unidade formadora de colônia eritroide (CFU-E);

5 Unidade formadora de explosão eritróide (BFU-E); mistura de unidade formadora de colônias de multilinhagem (CFU-GM/M/Eosi).

A Figura 12 mostra um esquema para os testes clínicos usando o sangue do cordão umbilical humano tratado com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>.

A Figura 13 mostra a análise da expressão de todo o genoma do protocolo de tratamento de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>. A Figura 13A mostra a expressão de gene em células tratadas a 4°C durante 1 hora. As células foram tratadas com 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> (eixo y; N=3) comparado aos controles de DMSO (N=3). A Figura 13B mostra a expressão de gene em células tratadas a 37°C por 2 horas. As células foram tratadas com 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> (eixo y; N=3) em relação aos controles de DMSO (N=3).

15 A Figura 14 mostra estudos de validação de análise de expressão de genes para células incubadas tratadas com 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> incubação a 37°C usando a plataforma de expressão de gene Fluidigm. A Figura 14A mostra a expressão de gene de um grupo de genes selecionados em Células CD34<sup>+</sup> tratadas com 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 37°C por 0, 20, 40, 60, 80, 120, 180 e 240 minutos em comparação às células tratadas com veículo. A Figura 14B mostra a média de expressão de gene dos genes de assinatura listados na Tabela 3 em Células CD34<sup>+</sup> tratadas com 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 37°C por 0, 20, 40, 60, 80, 120, 180 e 240 minutos em comparação às células tratadas com veículo. Os genes a seguir tiveram desempenho fraco e foram excluídos ao determinar a média de expressão de gene, mostrada na figura 14B: ARPC2, CXCL5, CXCL6, FGF9, GNAL, GULP1, LRIG2, PDE4D, PLAT(1), PLAT(2), SSTR1, SYT4 e TMCC3. Os genes housekeeping a seguir foram usados para normalização ao determinar a média de expressão de gene mostrada no painel B: ACTB, GAPDH, HPTR1, e QARS. A Figura 14C mostra a média de expressão de gene de CXCR4 em Células CD34<sup>+</sup> tratadas com 10 µM de 16,16-dimetil PGE2 a 37°C por 0, 20, 40, 60, 80, 120, 180 e 240 minutos em comparação às células tratadas com veículo. Todos os perfis de expressão de gene para a Figura 14 foram obtidos após tratamento de células pelo tempo especificado e sem outras incubações das células após o tratamento.

30 A Figura 15 mostra células tratadas com tratamento de pulso de 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> suficiente para direcionar o efeito biológico completo ou células tratadas com DMSO. Células CD34<sup>+</sup> foram incubadas com 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> por tempos diferentes como mostrado (0, 20, 40, 80 e 120 minutos) seguido por um período de recuperação sem 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 37°C, de modo que o tempo de incubação total foi de 120 minu-

tos. Os dados foram analisados utilizando a plataforma de expressão de gene Fluidigm. As Figuras 15A e 15B mostram a média de expressão de gene dos genes de assinatura listados na Tabela 3 em Células CD34<sup>+</sup> tratadas com 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> ou DMSO a 37°C por 5, 15, 30, 60, e 120 minutos comparado aos controles tratados com veículo. Os genes a seguir tiveram desempenho fraco e foram excluídos ao determinar a média de expressão de gene, mostrada na figura 15B: ACDY7, CCND1, CREB5, GULP1, MPPE1, PDE3B, PTGER2, RGS2, e YPEL4. Os genes housekeeping a seguir foram usados para normalização ao determinar a média de expressão de gene mostrada na Figura 15B: ACTB, ARPC2, GAPDG, HPRT1, LRIG2, e QARS. Perfis de expressão de gene foram obtidos após o período de incubação de 120 minutos.

A Figura 16 mostra o efeito da concentração de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> ou tratamento com DMSO na expressão de gene usando a plataforma de expressão do gene Fluidigm. As Figuras 16A e 16B mostram a média de expressão de gene dos genes de assinatura listados na Tabela 3 em Células CD34<sup>+</sup> tratadas com 0, 0,1, 1, 10, 50 e 100µM 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> ou DMSO por 120 minutos a 37°C em comparação às células tratadas com veículo. Os genes a seguir tiveram desempenho fraco e foram excluídos ao determinar a média de expressão de gene, mostrada na figura 16B: ACDY7, CCND1, CREB5, GULP1, FGFR1, FLJ27352, MPPE1, PDE4D, PTGER2, PDG3B, e YPEL4. Os genes housekeeping a seguir foram usados para normalização ao determinar a média de expressão de gene mostrada na Figura 16B: ACTB, ARPC2, GAPDG, HPRT1, LRIG2, e QARS.

A figura 17 mostra a análise da expressão de genes de células tratadas com 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 37°C por 2 horas em comparação às células tratadas com DMSO. A Figura 17A mostra a análise de expressão de todo o genoma das células de sangue de cordão totais tratadas com 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 37°C por 2 horas em relação às células de sangue de cordão tratadas com DMSO. A Figura 17B mostra a análise da expressão de todo o genoma de Células CD34<sup>+</sup> Lin+ tratadas com 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 37°C por 2 horas em relação às Células CD34<sup>+</sup> Lin(+) tratadas com DMSO. A figura 17C mostra a análise da expressão de todo o genoma de células CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> Lin(-) tratadas com 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 37°C por 2 horas em comparação às células CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> Lin(-) tratadas com DMSO. A figura 17D mostra a análise da expressão de todo o genoma de células CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> CD90<sup>+</sup> Lin(-) tratadas com 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 37°C por 2 horas em comparação às células CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> CD90<sup>+</sup> Lin(-) tratadas com DMSO.

A Figura 18 mostra a expressão do CXCR4 em células tratadas com 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> tratadas em temperaturas diferentes por diferentes períodos de tempo. A Figura 18A mostra as condições experimentais comparadas nesta série de experimentos. A Figura 18B mostra a expressão de superfície celular CXCR4 em 1, 6 e 24 horas pós-

tratamento em células tratadas com 10  $\mu$ M de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> ou DMSO a 4°C por 1 hora e células tratadas com 10  $\mu$ M de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> ou DMSO a 37°C por 2 horas.

A Figura 18C mostra o percentual de células que expressam CXCR4 na superfície celular em 1, 6 e 24 horas pós-tratamento em células tratadas com 10  $\mu$ M de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> ou DMSO a 4°C por 1 hora e células tratadas com 10  $\mu$ M de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> ou DMSO a 37°C por 2 horas.

A Figura 19 mostra a análise de proliferação e viabilidade de Células CD34<sup>+</sup> tratadas com 10  $\mu$ M de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> nos tempos e temperaturas indicadas. As células tratadas foram então analisadas usando um teste *in vivo* de CFU-S. A Figura 19A mostra que a incubação a 37°C aumenta o número de células hematopoiéticas progenitoras.

A Figura 19B mostra dados de viabilidade celular para células de sangue totais de cordão umbilical humano incubadas com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> em várias concentrações durante 120 minutos a 4°C, 25°C, e 37°C. A Figura 19C mostra dados de viabilidade celular para células humanas CD34<sup>+</sup> incubadas com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> em várias concentrações durante 120 minutos a 4°C e 37°C. A Figura 19D mostra um aumento na formação de colônia CFU-C em Células CD34+ tratadas com dmPGE<sub>2</sub> a 37°C em comparação a Células CD34<sup>+</sup> tratadas com DMSO ou com dmPGE<sub>2</sub> em 4°C.

A Figura 20 mostra um fluxograma experimental para um teste funcional de quimiotaxia *in vitro*. Células CD34<sup>+</sup> são tratadas com 10  $\mu$ M de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> ou controle DMSO por 4 horas, e, em seguida, transferidas para um ensaio de poço de migração por 4 horas na presença de 0 - 50ng/ml SDF1 $\alpha$ .

A Figura 21 mostra dados representativos para um teste funcional de quimiotaxia *in vitro*. Células CD34<sup>+</sup> são tratadas com 10  $\mu$ M de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> ou controle DMSO por 4 horas, e, em seguida, transferidas para um ensaio de poço de migração por 4 horas na presença de 0 - 50ng/ml SDF1 $\alpha$ .

A Figura 22A mostra a análise da expressão de todo o genoma de Células CD34<sup>+</sup> tratadas com 10  $\mu$ M de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> durante 120 minutos a 4°C, 25°C, ou 37°C (eixo y) contra células tratadas com veículo (eixo x). A Figura 22B fornece a média das alterações em múltiplos para um subconjunto dos genes de assinatura nas células a partir da análise de expressão, ilustrada na Figura 22A.

A Figura 23A mostra a análise da expressão de todo o genoma de Células CD34<sup>+</sup> tratadas em 37°C com 10  $\mu$ M dmPGE<sub>2</sub> ou forskolina (eixo y) por 120 minutos contra células tratadas por veículo (eixo x). A Figura 23B (paineel superior) mostra a média em múltiplos das alterações para um subconjunto dos genes de assinatura ilustrado na Figura 23A nas células tratadas com dmPGE<sub>2</sub> ou forskolina. A Figura 23B (paineel inferior) mostra a média das alterações em múltiplos pelo Fluidigm qPCR para um subconjunto dos genes de assinatura em Células CD34<sup>+</sup> tratado a 37°C com 1mM dbcAMP por 120 minutos ou tratado com

dmPGE<sub>2</sub> por 120 minutos.

A Figura 24 mostra uma estratégia experimental para a realização de transplantes de células hematopoiéticas em camundongos utilizando as composições terapêuticas da invenção.

5                   DESCRIÇÃO DETALHADA

A.                   Introdução

A invenção fornece composições terapêuticas e métodos para melhorar a eficácia de transplante de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras e direciona os desafios multifacetados enfrentados pela profissão médica neste campo de terapia celular regenerativa. Os inventores analisaram diversos parâmetros biológicos das populações de células tronco hematopoiéticas e progenitoras tratadas com agentes que modificam a expressão de gene das células, incluindo os agentes que estimulam a via de prostaglandina e regulam para cima a expressão de gene e superfície celular de CXCR4, a fim de desenvolver métodos para aumentar a eficácia de células tronco hematopoiéticas e progenitoras usadas em transplantes de células tronco. A efetividade da população de células na reconstituição do sistema hematopoiético de um sujeito no transplante depende de tais propriedades como a capacidade da população de células para retornar e enxertar na medula óssea, se auto-renovar, e proliferar *in vivo*. A invenção fornece um método para a modulação de uma população de células para melhorar tais propriedades celulares e fornecer melhorias terapêuticas resultantes na reconstituição hematopoiética.

Especificamente, a invenção fornece composição terapêutica compreendendo uma população melhorada de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras humanas, e métodos de fazer e usar a composição terapêutica melhorada em transplantes de células tronco. A composição terapêutica da invenção compreende uma população de células tronco humanas hematopoiéticas ou progenitoras que foram modificadas *ex vivo* para melhorar as propriedades terapêuticas da população de células antes do uso da população de células em terapias de transplante. As células modificadas de uma composição terapêutica demonstram uma capacidade aumentada para retornar e enxertar na medula óssea, e, além disso, possuem melhor viabilidade celular e capacidades de auto-renovação.

As propriedades terapêuticas das células tronco hematopoiéticas e progenitoras da composição terapêutica, incluindo capacidades de enxerto e retorno das células, são aumentadas por um método de tratamento da população de células *ex vivo* com um agente que modifica a expressão de genes na célula que se acredita estar associada com retorno e enxerto de células, incluindo CXCR4. Assim, o método da invenção inicia as células compreendendo a composição terapêutica para obter o efeito terapêutico mais benéfico no transplante de células. No método da invenção, as células tronco hematopoiéticas ou progenitoras de uma composição terapêutica são tratadas com o agente *ex vivo* em temperatu-

ras fisiologicamente relevantes, resultando em expressão de genes aumentada associados com as propriedades biológicas benéficas das células, como retorno, enxerto, e expansão *in vivo* da população de células. A composição terapêutica compreendendo as células tronco hematopoiéticas ou progenitoras melhoradas é demonstrada nos exemplos descritos abaixo 5 possuindo vantagens em retorno, enxerto e proliferação.

A composição terapêutica, portanto, fornece um método de melhorar o potencial de enxerto de células do sangue, incluindo células do sangue colhidas e, para clareza, sangue do cordão, e um método para melhor retorno, viabilidade e auto-renovação em transplantes de células hematopoiéticas. Além disso, a presente invenção fornece métodos de expansão 10 de células tronco hematopoiéticas e progenitoras *in vivo*. As composições terapêuticas e métodos descritos na presente invenção podem permitir a utilização de uma parte ou unida- de de cordão em transplantes de sangue de cordão.

O atual padrão de cuidados para manipulação de células tronco hematopoiéticas antes do transplante requer controle rigoroso da temperatura a 4°C para maximizar a viabi- 15 dade celular e o sucesso do enxerto após o transplante. A invenção demonstra que a esti- mulação da via de sinalização celular de prostaglandina em células tronco hematopoiéticas e progenitoras sob condições que se acredita estarem associadas com a diminuição da via- bilitade celular e meia-vida do agente (como a manipulação de células a 37°C por um perí- 20 odo de duas horas) inesperadamente resulta em aumento da capacidade das células para retornar à medula óssea, aumento da auto-renovação, e aumento do potencial de enxerto das células tronco/progenitoras, sem afetar negativamente a viabilidade celular. Mais parti- cularmente, os inventores descobriram que a prolongada exposição (de pelo menos uma 25 hora) de células tronco hematopoiéticas e progenitoras com um agente de tratamento que exerce a atividade de PGE<sub>2</sub> em temperaturas fisiologicamente relevantes, como a tempe- tura do corpo, é necessária para obter um efeito biológico completo. Nomeadamente, o tra- tamento de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras por curtas durações de tempo 30 em temperaturas fisiologicamente relevantes resulta em aumento da produção de cAMP, mas inesperadamente não resulta em aumento da expressão de genes que se acreditava estarem associados com retorno e enxerto de células. Tempos mais longos de tratamento celular em temperatura fisiologicamente relevante são necessários para alcançar aumento da expressão de gene, e são demonstrados pela presente invenção como necessários para atingir os efeitos biológicos desejados de aumento de retorno e enxerto de células. Sem querer se ligar a qualquer teoria particular, os métodos aqui descritos resultam em aumento 35 da proliferação e enxerto potencial de células tronco hematopoiéticas e progenitoras após administração a um sujeito.

A prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) exerce sua função agindo sobre um número de diferen- tes receptores de prostaglandina em vários tipos de células, ativando várias vias de sinaliza-

ção, incluindo, entre outras, a via da PI3-quinase (PI3-K ou PI3K). Estes receptores de prostaglandina representam uma subfamília de receptores de superfície celular de sete transmembranas denominados receptores acoplados à proteína G (GPCRs). Existem quatro subtipos de receptores de prostaglandina E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>R1, PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>R<sub>3</sub> e PGE<sub>2</sub>R<sub>4</sub>. Quando ativado por um ligante apropriado, ou agonista, como uma prostaglandina ou análogo da mesma, por exemplo, um agonista PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub> ou PGE<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, estes receptores de prostaglandina iniciam uma variedade de funções biológicas à jusante. Por exemplo, a estimulação/ativação de sinalização celular de PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub> e/ou PGE<sub>2</sub>R<sub>4</sub> em células tronco hematopoiéticas e progenitoras é acoplada, em parte, à ativação da proteína G alfa-s (G $\alpha$ -s ou G $\alpha$ -s) e estimulação de adenilato ciclase.

A ativação de adenilato ciclase cataliza a conversão de ATP em cAMP. O aumento na concentração do segundo mensageiro cAMP pode levar à ativação de canais iônicos regulados por nucleotídeos cíclicos, proteínas de troca ativadas por cAMP como RAPGEF3. A especificidade de sinalização entre um GPCR e seu último alvo molecular por meio de uma via dependente de cAMP pode ser obtida através da formação de um complexo multi-protéico, incluindo o GPCR, adenilato ciclase e a proteína efetora.

Conforme observado acima, o AMP cíclico ativa a proteína quinase A (PKA, também conhecida como proteína quinase dependente de cAMP). PKA é normalmente inativa como uma holoenzima tetramérica, consistindo de 2 unidades catalíticas e 2 unidades reguladoras (C<sub>2</sub>R<sub>2</sub>), com as unidades reguladoras bloqueando os centros catalíticos das unidades catalíticas. O AMP cíclico se liga a locais específicos nas unidades reguladoras de PKA, dissocia as subunidades catalíticas e regulatórias, e, desse modo, ativa as unidades catalíticas, permitindo que as mesmas fosforilem as proteínas do substrato. Nem todas as proteínas quinases respondem ao cAMP, já que vários tipos de proteínas quinases não são dependentes de cAMP, incluindo, por exemplo, a proteína quinase C.

As subunidades ativas de PKA podem catalisar a transferência de fosfato do ATP para resíduos específicos de treonina ou serina de substratos de proteína. As proteínas quinases fosforiladas podem agir diretamente sobre canais de íons na célula, ou podem ativar ou inibir outras enzimas. O PKA também fosforila proteínas específicas que se ligam às regiões promotoras do DNA, causando aumento da expressão de genes específicos. Mais efeitos à jusante dependem das várias funções do PKA, que podem variar com base no tipo de célula. Por exemplo, o PKA ativado pode fosforilar um número de outras proteínas, incluindo, por exemplo, proteínas que convertem o glicogênio em glicose, proteínas que promovem a contração muscular no coração, levando a um aumento na frequência cardíaca, e fatores de transcrição que regulam a expressão de genes.

Assim, a estimulação das vias de sinalização celulares PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>R<sub>4</sub> pode levar ao aumento da ativação de fatores de transcrição como a proteína de ligação ao ele-

mento de resposta ao cAMP (CREB), e genes-alvo da CREB, por exemplo, modulador de elemento de resposta do cAMP (CREM) (ver Figura 1). A administração de células tronco hematopoiéticas e progenitoras que possuem cAMP aumentado podem manter a viabilidade de células tronco hematopoiéticas/progenitoras, aumentar o retorno, aumentar a auto-renovação, e possibilitar aumento do enxerto e aumento da expansão da população de células transplantada *in vivo*.

A estimulação/ativação de sinalização celular PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>R<sub>4</sub> é também associada com aumento da fosforilação da glicogênio sintase-quinase 3 (GSK-3) e aumento da sinalização de B-catenina (Hull *et al.*, 2004; Regan, 2003), ambos os quais indicam a ativação da via Wnt.

A estimulação PGE<sub>2</sub> da via Wnt pode aumentarativamente a proliferação de células tronco hematopoiéticas/progenitoras, e auto-renovação por meio de sinalização a partir do nicho de células-tronco, bem como dentro das próprias células (North *et al.*, 447(7147) *Nature* 1007-11 (2007)). A ativação da via Wnt em células tronco hematopoiéticas e progenitoras pode também levar a um aumento da expansão de uma população de células *in vivo*.

A estimulação PGE<sub>2</sub>R<sub>4</sub> também demonstrou ativar a via PI3K, e também pode ser importante para alcançar os efeitos biológicos desejados do aumento do retorno de células-tronco, proliferação, sobrevivência e enxerto. A estimulação/ativação de sinalização celular PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, como a via PI3K, também pode aumentar a expressão de genes importantes para o retorno e o enxerto de células tronco, por exemplo, o receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4), selectinas, integrinas.

Antes da atual descoberta, células tronco hematopoiéticas e progenitoras foram tratadas com compostos sob a crença de que os receptores EP poderiam ser totalmente saturados com o composto testado sob condições que maximizaram a viabilidade celular e também a estabilidade do composto de tratamento. O tratamento a 4°C, pelo padrão atual de cuidado para transplantes de células tronco hematopoiéticas, acreditava-se fornecer um aumento da viabilidade celular às células tratadas, bem como um expectativa de meia-vida aumentada dos compostos testados nesta temperatura comparado a temperaturas mais altas, por exemplo, 25°C ou 37°C, e tempos de incubação mais longos, por exemplo, duas, três, quatro, ou mais horas.

Sem querer se vincular a qualquer teoria particular, a invenção contempla, em parte, que enxerto de células tronco hematopoiéticas e progenitoras, a capacidade das células para retorna à medula óssea, e a auto-renovação das células pode ser aumentada, e a viabilidade celular mantida, tratando-se as células com temperaturas aumentadas durante longos períodos de incubação com agentes que aumentam a expressão de genes associados a retorno e enxerto.

Os agentes relevantes incluem, por exemplo, composições de prostaglandina E<sub>2</sub>

melhoradas e agentes contendo atividade dmPGE<sub>2</sub>, incluindo análogos de cAMP e melhoradores, e/ou ativadores G $\alpha$ -s. Além disso, a presente invenção demonstra que a administração de células tratadas com tais agentes, incluindo a prostaglandina E<sub>2</sub> e agentes contendo atividade dmPGE<sub>2</sub>, em temperaturas fisiologicamente relevantes (como temperatura corporal, ou 37°C) por longos períodos de incubação (ou seja, pelo menos uma hora) leva não apenas ao aumento de enxerto de células, mas também resulta em uma expansão *in vivo* da população de células tronco hematopoiéticas e progenitoras.

Assim, em várias modalidades, a invenção fornece composição terapêutica compreendendo células tronco hematopoiéticas ou progenitoras humanas que foram contatadas *ex vivo* em uma temperatura de cerca de 37°C com um agente capaz de aumentar a expressão de gene CXCR4 nas células. A invenção também fornece métodos de preparação de células tronco hematopoiéticas e progenitoras para uso como composição terapêutica para reconstituição hematopoiética compreendendo contatar uma população de células tronco hematopoiéticas e/ou progenitoras humanas com um agente capaz de aumentar a expressão de gene CXCR4 nas células, como um agente que estimula a via de prostaglandina, sob condições que otimizam o enxerto e a expansão da população de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras.

Os artigos "um", "uma", e "o/a" são aqui usados para se referir a um ou a mais de um (ou seja, pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. A título de exemplo, "um elemento" significa um elemento ou mais do que um elemento.

O uso da alternativa (por exemplo, "ou") deve ser entendido significando qualquer um, dois, ou qualquer combinação dos mesmos ou das alternativas. Como usado aqui, os termos "incluem" e "compreendem" são usados como sinônimos.

Como usado aqui, o termo "cerca de" ou "aproximadamente" se refere a uma quantidade, nível, valor, número, frequência, percentual, dimensão, tamanho, quantidade, peso ou comprimento que varia de acordo com cerca de 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% ou 1% para uma referência de quantidade, nível, valor, número, frequência, percentual, dimensão, tamanho, quantidade, peso ou comprimento. Em uma modalidade, o termo "cerca de" ou "aproximadamente" se refere a uma quantidade, nível, valor, número, frequência, percentual, dimensão, tamanho, quantidade, peso ou comprimento  $\pm$  15%,  $\pm$  10%,  $\pm$  9%,  $\pm$  8%,  $\pm$  7%,  $\pm$  6%,  $\pm$  5%,  $\pm$  4%,  $\pm$  3%,  $\pm$  2%, ou  $\pm$  1% sobre uma referência de quantidade, nível, valor, número, frequência, percentual, dimensão, tamanho, quantidade, peso ou comprimento.

Ao longo desta especificação, salvo indicação em contrário do contexto, as palavras "compreendem," "compreende" e "compreendendo" serão entendidas para sugerir a inclusão de uma etapa declarada ou elemento ou grupo de etapas ou elementos, mas não a exclusão de qualquer outra etapa ou elemento ou grupo de etapas ou elementos. Por "consiste

- de" entende-se incluindo e limitado a, o que quer que siga a frase "consiste de". Assim, a expressão "consiste de" indica que os elementos listados são necessários ou obrigatórios, e que outros elementos não podem estar presentes. Por "consiste essencialmente de" entende-se incluindo quaisquer elementos listados após a frase, e limitado a quaisquer outros
- 5 elementos que não interfiram com ou contribuem para a atividade ou ação especificada na divulgação para os elementos listados. Assim, a frase "consiste essencialmente de" indica que os elementos listados são necessários ou obrigatórios, mas que outros elementos não são opcionais e podem ou não estar presentes, dependendo se afetam ou não a atividade ou ação dos elementos listados.
- 10 A referência ao longo desta especificação a "uma modalidade" ou "uma modalidade de" significa que uma característica particular, estrutura ou característica descrita em conjunto com a modalidade é incluída em pelo menos uma modalidade da presente invenção. Assim, as aparências das frases "em uma modalidade" ou "em uma modalidade" em vários lugares em toda esta especificação não necessariamente se referem à mesma modalidade.
- 15 Além disso, os aspectos particulares, estruturas ou características particulares podem ser combinadas de forma adequadas em uma ou mais modalidades.

B. Composições Terapêuticas da Invenção

- A invenção fornece composição terapêutica compreendendo uma população de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras humanas suspendidas em uma solução estéril, terapeuticamente aceitável, apropriada para administração ao paciente. A composição terapêutica da invenção compreende uma população de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras humanas em que as células tronco hematopoiéticas ou progenitoras foram contadas *ex vivo* com um ou mais agentes capazes de aumentar a expressão de gene CXCR4 nas células, e onde as células são caracterizadas por uma assinatura de expressão de gene compreendendo expressão aumentada em relação às células tronco ou progenitoras não contatadas de CXCR4. As células tronco hematopoiéticas ou progenitoras podem ser caracterizadas com base no aumento dos níveis de expressão do gene e superfície celular CXCR4.

Em uma composição terapêutica da invenção, a expressão de gene de CXCR4 nas células tronco hematopoiéticas ou progenitoras é aumentada em pelo menos 2, 3, 4, 5, 10, 15, ou 20 vezes comparada à expressão de CXCR4 em células não contatadas.

A composição terapêutica da invenção pode ser caracterizada ainda por uma assinatura de expressão de gene em que a expressão de um ou mais genes de assinatura selecionados do grupo que consiste de hialuronan sintase 1 (HAS1), proteína GEM de ligação a GTP (GEM), proteína fosfatase 4 de especificidade dual (DUSP4), anfiregulina (AREG), Proteína 1 relacionada a receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento responsável de cAMP (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), e antígeno 2 relacionado a Fos

(FOSL2) é aumentada, em relação a células não contatadas.

Como usado aqui, uma célula "não contatada" é uma célula que não foi tratada, por exemplo, cultivada, contatada ou incubada com um agente que não é um agente de controle. Células contatadas com DMSO (um agente de controle), ou contatada com outro veículo são 5 células não contatadas.

Um "gene de assinatura", como usado aqui, significa qualquer gene no conjunto de gene de assinatura fornecido na Tabela 3. Por exemplo, genes de assinatura incluem hialuronan sintase 1 (HAS1), proteína GEM de ligação a GTP (GEM), proteína fosfatase 4 de especificidade dual (DUSP4), anfiregulina (AREG), Proteína 1 relacionada a receptor nuclear 10 (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento responsivo de cAMP (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), antígeno 2 relacionado a Fos (FOSL2), ou receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4). Para esclarecimento, genes de assinatura não incluem genes housekeeping.

A expressão de um gene de assinatura pode ser aumentada por 2 ou mais vezes comparada às células não contatadas, e, em modalidades particulares, é aumentada em 15 pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 10, 15, ou 20 vezes. Em algumas modalidades, a expressão de um ou mais genes de assinatura é aumentada em células compreendendo uma composição terapêutica da invenção. Em modalidades particulares, a expressão de pelo menos 2, 3, 4, ou mais genes de assinatura é aumentada em pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 10, 15, ou 20 vezes 20 comparada às células não contatadas. Em várias modalidades, a expressão de um gene de assinatura pode ser aumentada em pelo menos 6 vezes comparada às células não contatadas.

Em modalidades particulares da invenção, a expressão de gene de CXCR4 é aumentada em pelo menos cerca de 4 vezes e a expressão de gene de CREM é aumentada em pelo menos cerca de 10 vezes.

25 As células tronco hematopoiéticas ou progenitoras humanas compreendendo a composição terapêutica podem ainda ser caracterizadas por um perfil de expressão de gene em que a média de alteração múltipla de todos os genes de assinatura é pelo menos cerca de 2, 4, ou 6 vezes. Em algumas modalidades, a média de alteração múltipla de todos os genes de assinatura é pelo menos cerca de 4. Em algumas modalidades, a média de alteração múltipla de todos os genes de assinatura é pelo menos cerca de 6. Em algumas modalidades, a média de alteração múltipla de pelo menos 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 30 ou 90% dos genes de assinatura é pelo menos 6 vezes. Em algumas modalidades, a média de alteração múltipla de pelo menos 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, ou 90% dos genes de assinatura é pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 vezes. Em modalidades particulares, a composição terapêutica pode ser caracterizada por um perfil de expressão de gene contendo a média de alteração múltipla para todos os genes de assinatura como descrito na 35 Figura 14(B), Figura 15(B), ou Figura 16(B).

A assinatura de expressão de gene das células tronco hematopoiéticas ou progenitoras humanas compreendendo a composição terapêutica pode ser analisada, *ou seja*, obtida, após as células serem tratadas com um agente, ou as células podem ser incubadas por algum período de tempo após o tratamento antes de analisar a assinatura de expressão de gene das células. Por exemplo, as células podem ser tratadas *ex vivo* com um agente, lavadas para remover o agente, e a expressão de gene analisada sem outra incubação das células. Alternativamente, em algumas modalidades as células são tratadas com um agente, lavadas para remover o agente da população de célula, e então as células são incubadas *ex vivo* por algum período de tempo antes de analisar a assinatura de expressão de gene das células.

Em algumas modalidades, as células são lavadas para remover agente e então incubadas por uma a seis horas antes da assinatura de expressão de gene das células ser analisada. Em algumas modalidades, as células são lavadas e então incubadas por pelo menos cerca de uma hora antes da assinatura de expressão de gene das células ser analisada. Em algumas modalidades, as células são lavadas e então incubadas por cerca de duas horas antes da assinatura de expressão de gene das células ser analisada.

“Expressão de gene” como usado aqui refere-se aos níveis relativos de expressão e/ou padrão de expressão de um gene em uma amostra biológica, como as células tronco hematopoiéticas e progenitoras, ou população de células tronco hematopoiéticas ou células progenitoras, na composição terapêutica da invenção. A expressão de um gene pode ser medido em um nível de cDNA, RNA, mRNA, ou combinações dos mesmos. “Perfil de expressão de gene” ou “assinatura de expressão de gene” refere-se aos níveis de expressão de vários diferentes genes medidos para a mesma amostra, *ou seja*, a população de células.

Qualquer método disponível na técnica para detectar expressão de genes caracterizando as células compreendendo a composição terapêutica da invenção é incluído aqui. Como usado aqui, o termo “detectar a expressão” significa determinar a quantidade ou presença de um transcrito de RNA ou seu produto de expressão de um gene. Métodos para detectar a expressão de genes, *ou seja*, perfilhamento de expressão de gene, incluem métodos a base de análise de hibridização de polinucleotídeos, métodos baseados em sequenciamento de polinucleotídeos, métodos de imunohistoquímica, e métodos a base de proteômica. Os métodos geralmente detectam produtos de expressão (por exemplo, mRNA) dos genes de interesse. Em algumas modalidades, métodos a base de PCR, como PCR de transcrição reversa (RT-PCR) (Weis et al., TIG 8:263-64, 1992), e métodos a base de arranjo como microarranjo (Schena et al., Science 270:467-70, 1995) são usados. Por “microarranjo” é pretendido um arranjo ordenado de elementos de arranjo hibridizáveis, como, por exemplo, sondas de polinucleotídeo, em um substrato. O termo “sonda” refere-se a qualquer molécula que é capaz de seletivamente ligar a uma biomolécula alvo pretendida especifica-

mente, por exemplo, um transcrito de nucleotídeo ou uma proteína codificada por ou correspondente a um gene intrínseco. As sondas podem ser sintetizadas por um especialista na técnica ou derivadas de preparações biológicas apropriadas. As sondas podem ser especificamente designadas para serem marcadas. Exemplos de moléculas que podem ser utilizadas como sondas incluem, entre outras, RNA, DNA, aptâmeros, proteínas, anticorpos, e moléculas orgânicas.

Métodos gerais para extração de RNA são bem conhecidos na técnica e são revelados em textos padrões de biologia molecular, incluindo Ausubel *et al.*, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York 1987-1999. Os métodos para extração de RNA de tecidos embutidos em parafílmelos são revelados, por exemplo, em Rupp e Locker (*Lab Invest.* 56:A67, 1987) e De Andres *et al.* (*Biotechniques* 18:42-44, 1995). Em particular, isolamento de RNA pode ser realizado usando um kit de purificação, um conjunto de tampão e protease de fabricantes comerciais, como Qiagen (Valencia, Calif.), de acordo com as instruções do fabricante. Por exemplo, RNA total de células em cultura pode ser isolado usando mini-colunas Qiagen RNeasy. Outros kits de isolamento de RNA comercialmente disponíveis incluem MASTERPURE. Kit de purificação completa DNA e RNA (Epicentre, Madison, Wis.) e kit de isolamento de RNA em bloco de parafina (Ambion, Austin, Tex.). RNA total de amostras de tecido pode ser isolado, por exemplo, usando RNA Stat-60 (Tel-Test, Friendswood, Tex.). Além disso, grandes números de amostras de tecido podem ser prontamente processados usando técnicas bem conhecidas aos especialistas na técnica, como, por exemplo, processos de isolamento de RNA de etapa única de Chomczynski (U.S. Pat. No. 4, 843, 155).

RNA isolado pode ser usado em ensaios de hibridização ou amplificação que incluem, entre outros, análise de PCR e ensaios de sonda. Um método para a detecção de níveis de RNA envolve contatar o RNA isolado com uma molécula de ácido nucleico (sonda) que pode ser hibridizado ao mRNA codificado pelo gene sendo detectado. A sonda de ácido nucleico pode ser, por exemplo, um cDNA de comprimento completo, ou uma parte do mesmo, como um oligonucleotídeo de pelo menos 7, 15, 30, 60, 100, 250, ou 500 nucleotídeos em comprimento e suficiente para especificamente hibridizar condições rígidas a um gene intrínseco da presente invenção, ou qualquer derivado DNA ou RNA. A hibridização de um mRNA com a sonda indica que o gene intrínseco em questão está sendo expresso.

Em uma modalidade, o mRNA é imobilizado em uma superfície sólida e contatada com uma sonda, por exemplo correndo o mRNA isolado em um gel agarose e transferindo o mRNA do gel a uma membrana, como nitrocelulose. Em uma modalidade alternativa, as sondas são imobilizadas em uma superfície sólida e o mRNA é contatada com as sondas, por exemplo, em um arranjo de Agilent gene chip. Um especialista na técnica pode prontamente adaptar métodos de detecção de mRNA conhecidos para uso na detecção do nível

de expressão de genes intrínsecos da presente invenção.

Um método alternativo para determinar o nível de expressão de gene em uma amostra envolve o processo de amplificação de ácido nucleico, por exemplo, por RT-PCR (Patente U.S. Pat. No. 4.683.202), reação de cadeia de ligase (Barany, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-93, 1991), replicação de sequência auto-sustentada (Guatelli *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-78, 1990), sistema de amplificação de transcrição (Kwoh *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-77, 1989), Q-Beta Replicase (Lizardi *et al.*, *Bio/Technology* 6:1197, 1988), replicação em círculo rolante (U.S. Pat. No. 5.854.033), ou qualquer outro método de amplificação de ácido nucleico, seguido pela detecção de moléculas amplificadas usando técnicas bem conhecidas aos especialistas na técnica. Estes esquemas de detecção são especialmente úteis para a detecção de moléculas de ácido nucleico se tais moléculas estão presentes em números muito pequenos.

Em aspectos particulares da invenção, a expressão de gene é avaliada por RT-PCR quantitativa. Vários diferentes protocolos de PCR ou QPCR são conhecidos na técnica e exemplificados aqui abaixo e podem ser diretamente aplicados ou adaptados usando as composições atualmente descritas para a detecção e/ou quantificação dos genes listados na Tabela 3. Geralmente, em PCR, uma sequência de polinucleotídeo alvo é amplificada por reação com pelo menos um iniciador de oligonucleotídeo ou par de iniciadores de oligonucleotídeo. Os iniciadores hibridizam a uma região complementar do ácido nucleico alvo e uma DNA polimerase se estende aos iniciadores para amplificar a sequência alvo. Em condições suficientes para fornecer produtos de amplificação de ácido nucleico a base de polimerase, um fragmento de ácido de um tamanho domina os produtos de reação (a sequência alvo de polinucleotídeo que é o produto de amplificação). O ciclo de amplificação é repetido para aumentar a concentração da sequência de polinucleotídeo alvo único. A reação pode ser realizada em qualquer termociclador comumente usado para PCR. No entanto, são cicladores preferenciais com capacidades de medição de fluorescência em tempo real, por exemplo, SMARTCYCLER (Cepheid, Sunnyvale, Calif.), ABI PRISM 7700. (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), ROTOR-GENE (Corbett Research, Sydney, Australia), LIGHTCYCLER (Roche Diagnostics Corp, Indianapolis, Ind.), ICYCLER (Biorad Laboratories, Hercules, Calif.) e MX4000 (Stratagene, La Jolla, Calif.).

PCR quantitativa (QPCR) (ainda referenciada como PCR tempo real) é preferencial em algumas circunstâncias porque este fornece não somente uma medição quantitativa, mas ainda tempo e contaminação reduzidos. Em alguns casos, a disponibilidade de técnicas de perfilamento de expressão de gene é limitada devido aos requisitos para tecido fresco e congelado e equipamento de laboratório especializado, tornando o uso rotineiro de tais tecnologias difíceis em um ambiente clínico. Como usado aqui, "PCR quantitativa (ou "QPCR tempo real") refere-se a monitoramento direto do progresso de amplificação de PCR con-

5 forma ocorre sem a necessidade para amostragem repetida dos produtos de reação. Em PCR quantitativa, os produtos de reação podem ser monitorados através de um mecanismo de sinalização (por exemplo, fluorescência) conforme são gerados e são rastreados após o sinal surgir acima de um nível de background mas antes a reação atinge um platô. O número de ciclos requerido para atingir um nível detectável ou "limiar" de fluorescência varia diretamente com a concentração de alvos amplificáveis no começo do processo PCR, permitindo uma medida de intensidade de sinal da quantidade de ácido nucleico alvo em uma amostra em tempo real.

10 Em outra modalidade da invenção, microarranjos são usados para perfilhamento de expressão. Microarranjos são particularmente bem estudados para esta finalidade devido a 15 reprodutibilidade entre experimentos diferentes. Microarranjos de DNA fornecem um método para a medição simultânea dos níveis de expressão de grandes números de genes. Cada arranjo consiste de um padrão reproduzível de sondas de captura ligadas a um suporte sólido. RNA ou DNA rotulado é hibridizado para sondas complementares no arranjo e então 20 detectadas por varredura a laser. As intensidades de hibridização para cada sonda no arranjo são determinados e convertidos a um valor quantitativo representando níveis de expressão de gene relativos. Ver, por exemplo, Patente U.S. Nos. 6.040.138, 5.800.992 e 6.020.135, 6.033.860, e 6.344.316. Arranjos de oligonucleotídeo de alta densidade são particularmente úteis para determinação de perfil de expressão de gene por um grande número de RNAs em uma amostra.

Análise de microarranjo pode ser realizada por equipamento comercialmente disponível seguindo protocolos do fabricante, como usando a tecnologia Affymetrix GenChip, tecnologia Illumina Bead Array, ou tecnologia de microarranjo em jato de tinta Agilent.

25 "Normalização" pode ser usada para remover variação entre amostras. Para dados de microarranjo, o processo de normalização tem por objetivo remover erros sistemáticos equilibrando as intensidades de fluorescência dos dois corantes de marcação. O viés do corante pode vir de várias fontes incluindo diferenças nas eficiências de marcação de corante, sensibilidades de calor e luz, bem como configurações do scanner para escanear dois canais. Alguns métodos comumente usados para calcular o fator de normalização incluem: 30 (i) normalização global que usa todos os genes no arranjo, como análise multiarranjo robusto em escala de log (RMA); (ii) normalização de genes housekeeping que usa gênes housekeeping/invariantes constantemente expressos; e (iii) normalização de controles internos que usam quantidades conhecidas de genes de controle exógenos adicionados durante hibridização (Quackenbush (2002) *Nat. Genet.* 32 (Suppl.), 496-501). Em uma modalidade, 35 expressão de genes revelada aqui pode ser normalizada para controlar genes housekeeping ou por análise multi-arranjo robusto em escala de log (RMA).

Em várias modalidades ilustrativas, a presente invenção fornece, em parte, compo-

sição terapêutica compreendendo a população de células para uso em um transplante, por exemplo, um transplante de medula óssea. Como usado aqui, os termos “população de células” referem-se a população de células heterogêneas ou homogêneas compreendendo células tronco hematopoiéticas e/ou progenitoras. A população de células compreendendo células tronco hematopoieticas e/ou progenitoras podem ser células de medula óssea, células de sangue de cordão umbilical, ou células de sangue periférico mobilizado, ou uma população de células obtida de qualquer fonte apropriada, incluindo medula óssea, sangue periférico mobilizado, e sangue de cordão umbilical entre outros. O termo “coleção de células” também refere-se a uma população de células, e em algumas modalidades é sinônimo com “população de células.” No entanto, uma coleção de células não precisa referir-se a qualquer população particular de células.

Células tronco hematopoieticas e/ou progenitoras, se obtidas de sangue de cordão, medula óssea, sangue periférico, ou outra fonte, podem ser crescidas, tratadas ou expandidas em qualquer meio comercialmente disponível apropriado ou customizado, com ou sem soro, como desejado (ver, por exemplo, Hartshorn et al., *Cell Technology for Cell Products*, pages 221-224, R. Smith, Editor; Springer Netherlands, 2007, aqui incorporado por referência em sua totalidade). Por exemplo, em certas modalidades, meio isento de soro pode utilizar albumina e/ou transferrina, que demonstrou ser útil para o crescimento e expansão de Células CD34<sup>+</sup> em meio isento de soro. Ainda, citocinas podem ser incluídas, como ligante Flt-3, fator de célula tronco (SCF), e trombopoietina (TPO), entre outros. HSCs pode ainda ser crescida em vasos como biorreatores (ver, por exemplo, Liu et al., *Journal of Biotechnology* 124:592-601, 2006, aqui incorporado por referência em sua totalidade). Um meio apropriado para expansão *ex vivo* de HSCs pode ainda compreender células de suporte HSC, como células estromais (por exemplo, células estromais linforeticulares), que podem ser derivadas, por exemplo, a partir da desagregação de tecido linfoide, e que demonstraram suportar manutenção *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo*, crescimento, e diferenciação de HSCs, bem como suas progenias.

Em modalidades particulares, a população de células não é expandida *ex vivo* ou *in vitro* antes da administração a um sujeito. Em modalidades particulares, uma população de células não expandida é obtida, a população de células é tratada *ex vivo* de acordo com o protocolo fornecido aqui, podem ser lavadas para remover o agente de tratamento, e administrada a um paciente sem expansão da população de célula *ex vivo*. Em algumas modalidades, as células são obtidas de um doador, incluindo sangue de cordão, e não são expandidas antes ou após o tratamento das células, ou em qualquer tempo antes da administração da composição terapêutica a um paciente. Em uma modalidade, uma população de células não expandida é tratada e é administrada a um paciente antes de qualquer divisão substancial *ex vivo* das células na população, ou antes do tempo requerido para qualquer

- divisão celular substancial *ex vivo*. Em outras modalidades, uma população de células não expandida é tratada e é administrada a um paciente antes de qualquer mitose substancial *ex vivo* das células na população, ou antes do tempo requerido para qualquer mitose substancial *ex vivo*. Em algumas modalidades, uma população de células não expandida é tratada e é administrada a um paciente antes da duplicação do tempo das células na população. Em algumas modalidades, uma população de células não expandida é tratada e é administrada a um paciente dentro de 6, 12, ou 24 horas de tratamento das células. Em outras modalidades, uma população de células não expandida é tratada e é administrada a um paciente dentro de 2 horas de tratamento das células.
- 10 Em várias modalidades, a população de células não é cultivada antes do tratamento com um agente *ex vivo* ou em qualquer tempo antes da administração a um paciente. Em algumas modalidades, a população de células é cultivada por menos do que cerca de 24 horas. Em outras modalidades, a população de células é cultivada por menos do que cerca de 12 horas, 10 horas, 8 horas, 6 horas, 4 horas, ou duas horas.
- 15 Em várias modalidades, a população de células que é tratada com um agente como descrito em outro ponto aqui e subsequentemente administrada a um sujeito é uma população de células heterogênea incluindo, medula óssea total, sangue de cordão umbilical, sangue periférico mobilizado, células tronco hematopoieticas, células hematopoieticas progenitoras, e a progenia de células tronco hematopoiéticas e progenitoras, incluindo granulócitos
- 20 (por exemplo, pró-mielócitos, mielócitos, metamielócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos), eritrócitos (por exemplo, reticulócitos, eritrócitos), trombócitos (por exemplo, megacarioblastos, megacariócitos produtores de plaquetas, plaquetas), e monócitos (por exemplo, monócitos, macrófagos).
- 25 Em uma modalidade, a composição terapêutica compreende uma população de célula que é cerca de 100% células tronco hematopoieticas e progenitoras. Em algumas modalidades, a população de células na composição terapêutica é menos do que cerca de 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, ou 30% células tronco hematopoieticas e progenitoras. A população de células em algumas modalidades é menos do que cerca de 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, ou 30% Células CD34<sup>+</sup>. Em outras modalidades,
- 30 a população de células é cerca de 0,1% a cerca de 1%, cerca de 1% a cerca de 3%, cerca de 3% a cerca de 5%, cerca de 10%- cerca de 15%, cerca de 15%-20%, cerca de 20%-25%, cerca de 25%-30%, cerca de 30%-35%, cerca de 35%-40%, cerca de 40%-45%, cerca de 45%-50%, cerca de 60%-70%, cerca de 70%-80%, cerca de 80%-90%, cerca de 90%-95%, ou cerca de 95% a cerca de 100% células tronco hematopoieticas e progenitoras. Em modalidades particulares, a população de células é cerca de 0,1% a cerca de 1%, cerca de 1% a cerca de 3%, cerca de 3% a cerca de 5%, cerca de 10%- cerca de 15%, cerca de 15%-20%, cerca de 20%-25%, cerca de 25%-30%, cerca de 30%-35%, cerca de 35%-40%, cerca de

40%-45%, cerca de 45%-50%, cerca de 60%-70%, cerca de 70%-80%, cerca de 80%-90%, cerca de 90%-95%, ou cerca de 95% a cerca de 100% Células CD34<sup>+</sup>.

As células na composição terapêutica da invenção podem ser autólogas/autogênicas (“próprias”) ou não autólogas (“não próprias,” *por exemplo*, alogênicas, singênicas ou xenogênicas). “Autólogo,” como usado aqui, refere-se às células de um mesmo sujeito. “Alogênica,” como usado aqui, refere-se as células da mesma espécie que diferem geneticamente á célula em comparação. “Singêntica,” como usado aqui, refere-se as células de um sujeito diferente que são geneticamente idênticas à célula em comparação. “Xenogênica,” como usado aqui, refere-se as células de uma espécie diferente para a célula em comparação. Em modalidades particulares, as células da invenção são alogênicas.

Uma “célula tronco” refere-se a uma célula que é uma célula indiferenciada capaz de (1) se auto renovar em longo prazo, ou a capacidade de gerar pelo menos uma cópia idêntica da célula original, (2) diferenciação em um único nível celular em vários, e em alguns casos somente um tipo celular especializado e (3) de regeneração funcional *in vivo* de tecidos. Células tronco são subclassificadas de acordo com seus potenciais de desenvolvimento como totipotente, pluripotente, multipotente e oligo/unipotente. Uma “célula progenitora” ainda tem a capacidade de se auto renovar e se diferenciar em mais células maduras, mas é cometida a uma linhagem (*por exemplo*, progenitoras hematopoieticas sao cometidas à linhagem sanguínea; progenitores mieloides são cometidas à linhagem mieloide; progenitores linfoides são cometidas à linhagem linfoide), enquanto que células tronco não são necessariamente assim limitadas. “Auto renovação” refere-se a uma célula com uma capacidade única de produzir células filhas inalteradas e, portanto, reabastecer e manter seus números de população, e para gerar tipos de célula especializada (potência). Auto renovação pode ser conseguida em duas formas. A divisão celular assimétrica produz uma célula filha que é idêntica à célula parental e uma célula filha que é diferente da célula parental e é uma célula diferenciada ou progenitora cometida. Divisão celular simétrica produz duas células filhas idênticas. “Proliferação” ou “expansão” de células refere-se a células que se dividem simetricamente.

Células tronco hematopoieticas (HSCs) dão origem a células progenitoras hematopoieticas cometidas (HPCs) que são capazes de gerar o repertório inteiro de células de sangue maduras ao longo de tempo de um organismo. O termo “célula tronco hematopoietica” ou “HSC” refere-se a células tronco multipotentes que dão origem a todos os tipos de células do sangue de um organismo, incluindo mieloides (*por exemplo*, monócitos e macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrócitos, megacariócitos/plaquetas, células dendríticas), e linhagens linfoides (*por exemplo*, células T, células B, células NK), e outras conhecidas na técnica (ver Fei, R., *et al.*, U.S. Patente No. 5.635.387; McGlave, *et al.*, patente U.S. No. 5.460.964; Simmons, P., *et al.*, patente U.S. No. 5.677.136; Tsukamoto, *et al.*, U.S. No.

5.750.397; Schwartz, *et al.*, U.S. No. 5.759.793; DiGuisto, *et al.*, patente U.S. No. 5.681.599; Tsukamoto, *et al.*, U.S. No. 5.716.827). Quando transplantada em animais irradiadas letalmente ou humanas, células tronco hematopoieticas pode repopular o eritroide, neutrófilo-macrófago, megacariócito e pool de célula hematopoiética linfoide.

5 HSCs podem ser identificados de acordo com certos marcadores fenotípicos ou genotípicos. Por exemplo, HSCs podem ser identificados por seus pequenos tamanhos, falta de marcadores de linhagem (lin), coloração fraca (população lateral) com corantes vitais como rodamina 123 (rodamina<sup>DULL</sup>, ainda chamado rho<sup>b</sup>) ou Hoechst 33342, e presença de vários marcadores de抗ígenos em suas superfícies, muitos dos quais pertencem ao cluster 10 de série de diferenciação (*por exemplo*, CD34, CD38, CD90, CD133, CD105, CD45, e c-kit, o receptor para fator de célula tronco). HSCs são principalmente negativos para os marcadores que são tipicamente usados para detectar linhagem cometida, e, assim, são geralmente referenciadas como células Lin(-). A maior parte das HSCs humanas pode ser caracterizada como CD34<sup>+</sup>, CD59<sup>+</sup>, Thy1/CD90<sup>+</sup>, CD38<sup>lo</sup>, C-kit/CD117<sup>+</sup>, e Lin(-). No entanto, nem todas as 15 células tronco são cobertas por estas combinações, como certas HSCs são CD34<sup>-</sup>/CD38<sup>-</sup>. Ainda alguns estudos sugerem que as células tronco mais precoces podem ser desprovidas de c-kit na superfície celular. Para HSCs humanas, CD133 podem representar um marcador precoce, conforme ambas CD34<sup>+</sup> e CD34<sup>-</sup> HSCs demonstraram ser CD133<sup>+</sup>. É conhecido na técnica que células CD34<sup>+</sup> e Lin(-) ainda incluem células progenitoras hematopoiéticas.

20 Fontes apropriadas de células tronco hematopoiéticas e progenitoras para uso nos métodos da presente invenção incluem, entre outras, células isoladas ou obtidas de um órgão do corpo contendo células de origem hematopoiética. Por “isolado” entende-se material que é removido de seu ambiente original. Por exemplo, uma célula é isolada se esta é separada de alguns ou todos os componentes que normalmente acompanham esta em seu estando nativo. Por exemplo, uma “população isolada de células,” uma “fonte isolada de células,” 25 ou “células tronco hematopoiéticas e progenitoras isoladas” e semelhantes, como usado aqui, referem-se a separação *in vitro* ou *ex vivo* de uma ou mais células de seu ambiente natural, e da associação com outros componentes do tecido ou órgão, *ou seja*, esta não é significativamente associada com substâncias *in vivo*.

30 Células tronco hematopoiéticas e progenitoras para uso nos métodos da presente invenção podem ser depletadas de células hematopoieticas maduras como células T, células B, células NK, células dendríticas, monócitos, granulócitos, células eritroides, e seus precursores cometidos de aspirado medula óssea, sangue de cordão umbilical, ou sangue periférico mobilizado (produto de leucaferese mobilizada). Celulas cometida de linhagem maduras são depletadas por imunodepleção, por exemplo, marcando substratos sólidos com anticorpos que se ligam a um painel de抗ígenos chamados “linhagem”: CD2, CD3, CD11b, 35 CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123, e CD235a. Uma etapa subsequente pode ser

realizada para ainda purificar a população de células, em que um substrato marcado com anticorpos se liga ao antígeno CD34<sup>+</sup> são usados para isolar células tronco hematopoiéticas e progenitoras primitivas. Kits são comercialmente disponíveis para purificar células tronco hematopoiéticas e progenitoras de várias fontes de células e em modalidades particulares, 5 estes kits são apropriados para uso com os métodos da presente invenção. Exemplos de kits comercialmente disponíveis para purificar células tronco hematopoiéticas e progenitoras incluem, entre outros Kit Lineage (Lin) Depletion (Miltenyi Biotec); kit de enriquecimento CD34<sup>+</sup> (Miltenyi Biotec); RosettaSep (Stem Cell Technologies).

A população de células compreendendo a composição terapêutica da invenção, em 10 algumas modalidades, compreende menos do que cerca de 30%, 25%, 20%, 15%, 10% ou 5% células tronco mesenquimais. Em modalidades particulares, a população de células compreende não mais do que cerca de 10% células tronco mesenquimais. Células tronco mesenquimais (MSCs) são células tronco multipotentes que podem ser diferenciar prontamente em linhagens incluindo osteoblastos, miócitos, condrócitos, e adipócitos (Pittenger, et 15 al., *Science*, Vol. 284, pg. 143 (1999); Haynesworth, et al., *Bone*, Vol. 13, pg. 69 (1992); Prockop, *Science*, Vol. 276, pg. 71 (1997)).

Em outras modalidades, a população de células compreendendo a composição terapêutica da invenção compreende menos do que cerca de 30%, 25%, 20%, 15%, 10% ou 5% células progenitoras endoteliais. Em outras modalidades, a população de células compreende menos do que cerca de 10% células progenitoras endoteliais. Como usado aqui, 20 “célula progenitora endotelial” refere-se a uma célula tronco multipotente ou unipotente com o potencial de se diferenciar em células endoteliais vasculares.

Em modalidades mais particulares, a população de células compreende não mais do que cerca de 10% células tronco mesenquimais ou células progenitoras endoteliais.

A população de células as obtida de um doador, ou de outra forma, fornecida, por 25 ser substancialmente isenta de células tronco mesenquimais e/ou células progenitoras endoteliais, e em modalidades particulares compreendem menos do que cerca de 10% células tronco mesenquimais e menos do que cerca de 10% células progenitoras endoteliais. A população de células pode alternativamente ser depletada de células tronco mesenquimais 30 e/ou células progenitoras endoteliais usando métodos conhecidos na técnica, por exemplo, usando técnicas de seleção imunomagnéticas, classificação de célula ativada por fluorescência, ou uma combinação destas. Os métodos de depleção podem ainda compreender o uso de pelo menos um anticorpo específico para pelo menos um de marcadores de superfície celular descritos aqui.

35 Em algumas modalidades, a população de células é depletada de células progenitoras endoteliais, incluindo células positivas para o marcador de superfície celular CD14 e negativo para CD45 (CD14+/CD45-) e/ou células positivas para VWF (fator de Von Willebrand)

(VWF+). Em outras modalidades, a população de célula é depletada de células positivas para CD73 e/ou marcadores de superfície celular CD140B. Em modalidades particulares da invenção, a população de células compreende células positivas para marcador de superfície celular CD34, e compreende menos do que cerca de 30%, 25%, 20%, 15%, 10% ou 5% das 5 células positivas para um marcador de superfície celular selecionado do grupo que consiste de CD73, CD140B, CD14 e VWF.

Em modalidades particulares, a população de células compreendendo a composição terapêutica da invenção compreende Células CD34<sup>+</sup> e compreende menos do que cerca de 30%, 25%, 20%, 15%, 10% ou 5% células CD14<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>. Em outras modalidades da invenção, a população de células compreende Células CD34<sup>+</sup> e compreende menos do que cerca de 30%, 25%, 20%, 15%, 10% ou 5% células VWF<sup>+</sup>. Em outras modalidades da invenção, a população de células compreende Células CD34<sup>+</sup> e compreende menos do que cerca de 30%, 25%, 20%, 15%, 10% ou 5% células CD140B<sup>+</sup>.

Em modalidades mais particulares, a população de células compreende CD34<sup>+</sup> células tronco hematopoiéticas ou progenitoras e compreende menos do que cerca de 30%, 25%, 20%, 15%, 10% ou 5% de células CD14<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, células VWF<sup>+</sup>, células CD73<sup>+</sup>, e células CD140B<sup>+</sup>. Em algumas modalidades, a população de células é positiva para o marcador de superfície celular CD34 e é negativa para pelo menos um marcador de superfície celular do grupo que consiste de CD14, VWF, CD73, e CD140B. Em outras modalidades, a população de células é positiva para o marcador de superfície celular CD34 e é negativa para os 20 marcadores de superfície celular CD14, VWF, CD73, e CD140B.

Células tronco hematopoiéticas e progenitoras podem ser obtidas ou isoladas a partir de medula óssea fracionada ou não fracionada de adultos, que inclui fêmures, quadril, costelas, esterno, e outros ossos. Células tronco hematopoiéticas e progenitoras podem ser 25 obtidas ou isoladas diretamente pela remoção a partir do quadril usando uma agulha e se-ringa, ou a partir do sangue, geralmente após pré-tratamento com citocinas, como G-CSF (fatores estimuladores de colônia e granulócito), que induz células a serem liberadas ou mobilizadas a partir do compartimento da medula óssea. Outras fontes de células tronco hematopoiéticas e progenitoras incluem sangue de cordão umbilical, sangue de placenta, e sangue 30 periférico mobilizado. Para fins experimentais, fígado fetal, baço fetal, medula renal, e AGM (Aorta-gonad-mesonephros) de animais são ainda fontes úteis de células tronco hematopoiéticas e progenitoras.

Em modalidades particulares, as células tronco hematopoiéticas ou progenitoras 35 são colhidas de uma fonte hematopoietica, *por exemplo*, células de medula óssea, sangue de cordão umbilical, ou células de sangue periférico mobilizado. “Colher” células tronco hematopoiéticas e progenitoras é definido como o desalojamento ou separação das células a partir da matriz. Isto pode ser conseguido usando um número de métodos, como métodos

enzimáticos, não enzimáticos, de centrífuga, elétrico, ou a base de tamanho, ou preferencialmente, lavando as células usando meio (*por exemplo* meio em que as células são incubadas). Em modalidades particulares, colher uma quantidade suficiente de células para transplante pode requerer mobilizar as células tronco e progenitoras no doador.

5 "Mobilização de célula tronco hematopoietica" refere-se a liberação das células tronco a partir da medula óssea na circulação do sangue periférico para fins de leucaferese, antes do transplante de célula tronco. Fatores de crescimento hematopoiéticos, *por exemplo*, fator estimulante de colônia de granulócito (G-CSF) ou agentes quimioterápicos geralmente são usados para estimular a mobilização. Drogas comerciais de mobilização de célula 10 existem e podem ser usadas em combinação com G-CSF para mobilizar quantidades suficientes de células tronco hematopoiéticas e progenitoras para transplante em um sujeito. Por exemplo, G-CSF e Mozobil™ (Genzyme Corporation) podem ser administradas a um doador para colher um número suficiente de células hematopoiéticas para transplante.

Aumentando o número de células tronco colhidas do doador, o número de células 15 tronco disponíveis para transplante de volta em um sujeito o resultado do sujeito pode ser significativamente melhorado, assim potencialmente reduzindo o tempo para o enxerto, e consequentemente liderando a uma redução no tempo durante o qual o sujeito tem insuficiente neutrófios e plaquetas, assim, prevenindo infecções, sangramentos, ou outras complicações. Outros métodos de mobilização de células tronco hematopoiéticas e progenitoras 20 poderiam ser aparentes a um especialista na técnica.

Em modalidades particulares, células tronco hematopoiéticas ou progenitoras são obtidas de sangue de cordão umbilical. Sangue de cordão podem ser colhidas de acordo com as técnicas conhecidas na técnica (*ver, por exemplo, patente U.S. Nos. 7.147.626 e 7.131.958, aqui incorporados por referência por tais metodologias*).

25 Em uma modalidade, células tronco hematopoiéticas e progenitoras para uso nas composições terapêuticos e métodos da invenção podem ser obtidas de fontes de célula tronco pluripotente, *por exemplo*, células tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) e células tronco embrionárias (ESCs). Como usado aqui, o termo "célula tronco pluripotente induzida" ou "iPSC" refere-se a uma célula não pluripotente que foi reprogramada a um estado pluripotente. Uma vez as células de um sujeito foram reprogramadas a um estado pluripotente, as 30 células podem então ser programadas a um tipo de célula desejada, como uma célula tronco hematopoietica ou progenitora. Como usado aqui, o termo "reprogramar" refere-se a um método de aumento da potência de uma célula a um estado menos diferenciado. Como usado aqui, o termo "programar" refere-se a um método de redução da potência de uma 35 célula ou diferenciar a célula a um estado mais diferenciado.

Em várias modalidades, a invenção contempla administração da composição terapêutica a um humano ou paciente, ou um sujeito em necessidade de terapia. A quantidade

de células tronco hematopoietica ou progenitoras contida na composição terapêutica e administrada a um paciente irá variar com a fonte das células, estado da doença, idade, sexo, e peso do indivíduo, e a capacidade das células tronco hematopoieticas e progenitoras para induzir uma resposta desejada no indivíduo.

- 5        Em uma modalidade, a quantidade de células tronco hematopoietica ou progenitoras (*por exemplo*, CD34<sup>+</sup>, células Lin(-)) na composição terapêutica administrada a um sujeito é a quantidade de células tronco hematopoietica ou progenitoras em cordão de sangue parcial ou único, ou pelo menos  $0,1 \times 10^5$  células, pelo menos  $0,5 \times 10^5$  células, pelo menos  $1 \times 10^5$  células, pelo menos  $5 \times 10^5$  células, pelo menos  $10 \times 10^5$  células, pelo menos  $0,5 \times 10^6$  células, pelo menos  $0,75 \times 10^6$  células, pelo menos  $1 \times 10^6$  células, pelo menos  $1.25 \times 10^6$  células, pelo menos  $1,5 \times 10^6$  células, pelo menos  $1.75 \times 10^6$  células, pelo menos  $2 \times 10^6$  células, pelo menos  $2,5 \times 10^6$  células, pelo menos  $3 \times 10^6$  células, pelo menos  $4 \times 10^6$  células, pelo menos  $5 \times 10^6$  células, pelo menos  $10 \times 10^6$  células, pelo menos  $15 \times 10^6$  células, pelo menos  $20 \times 10^6$  células, pelo menos  $25 \times 10^6$  células, ou pelo menos  $30 \times 10^6$  células.
- 10      Em uma modalidade particular, a quantidade de células tronco hematopoietica ou progenitoras (*por exemplo*, CD34<sup>+</sup>, células Lin(-)) na composição terapêutica é a quantidade de células tronco hematopoietica ou progenitoras em cordão de sangue parcial ou único, ou cerca de  $0,1 \times 10^5$  células a cerca de  $10 \times 10^5$  células; cerca de  $0,5 \times 10^6$  células a cerca de  $5 \times 10^6$  células; cerca de  $1 \times 10^6$  células a cerca de  $3 \times 10^6$  células; cerca de  $1,5 \times 10^6$  células a cerca de  $2,5 \times 10^6$  células; ou cerca de  $2 \times 10^6$  células a cerca de  $2,5 \times 10^6$  células.
- 15      Em uma modalidade particular, a quantidade de células tronco hematopoietica ou progenitoras na composição terapêutica é a quantidade de células tronco hematopoietica ou progenitoras em cordão de sangue parcial ou único, ou cerca de  $1 \times 10^6$  células a cerca de  $3 \times 10^6$  células; cerca de  $1.0 \times 10^6$  células a cerca de  $5 \times 10^6$  células; cerca de  $1.0 \times 10^6$  células a cerca de  $10 \times 10^6$  células, cerca de  $10 \times 10^6$  células a cerca de  $20 \times 10^6$  células, cerca de  $10 \times 10^6$  células a cerca de  $30 \times 10^6$  células, ou cerca de  $20 \times 10^6$  células a cerca de  $30 \times 10^6$  células.
- 20      Em outra modalidade, a quantidade de células tronco hematopoietica ou progenitoras na composição terapêutica é a quantidade de células tronco hematopoietica ou progenitoras em cordão de sangue parcial ou único, ou cerca de  $1 \times 10^6$  células a cerca de  $30 \times 10^6$  células; cerca de  $1.0 \times 10^6$  células a cerca de  $20 \times 10^6$  células; cerca de  $1.0 \times 10^6$  células a cerca de  $10 \times 10^6$  células, cerca de  $2.0 \times 10^6$  células a cerca de  $30 \times 10^6$  células, cerca de  $2.0 \times 10^6$  células a cerca de  $20 \times 10^6$  células, ou cerca de  $2.0 \times 10^6$  células a cerca de  $10 \times 10^6$  células.

- 25      Em uma modalidade particular, a quantidade de células tronco hematopoietica ou progenitoras na composição terapêutica é cerca de  $1 \times 10^6$  células tronco hematopoieticas ou progenitoras, cerca de  $2 \times 10^6$  células, cerca de  $5 \times 10^6$  células, cerca de  $7 \times 10^6$  células,
- 30      Em uma modalidade particular, a quantidade de células tronco hematopoietica ou progenitoras na composição terapêutica é cerca de  $1 \times 10^6$  células tronco hematopoieticas ou progenitoras, cerca de  $2 \times 10^6$  células, cerca de  $5 \times 10^6$  células, cerca de  $7 \times 10^6$  células,
- 35      Em uma modalidade particular, a quantidade de células tronco hematopoietica ou progenitoras na composição terapêutica é cerca de  $1 \times 10^6$  células tronco hematopoieticas ou progenitoras, cerca de  $2 \times 10^6$  células, cerca de  $5 \times 10^6$  células, cerca de  $7 \times 10^6$  células,

cerca de  $10 \times 10^6$  células, cerca de  $15 \times 10^6$  células, cerca de  $17 \times 10^6$  células, cerca de  $20 \times 10^6$  células cerca de  $25 \times 10^6$  células, ou cerca de  $30 \times 10^6$  células.

Em uma modalidade, a quantidade de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras) na composição terapêutica administrada a um sujeito é a quantidade de células tronco hematopoiética ou progenitoras em cordão de sangue parcial ou único, ou pelo menos 0,1 x 5  $10^5$  células/kg de peso corporal, pelo menos  $0,5 \times 10^5$  células/kg de peso corporal, pelo menos  $1 \times 10^5$  células/kg de peso corporal, pelo menos  $5 \times 10^5$  células/kg de peso corporal, pelo menos  $10 \times 10^5$  células/kg de peso corporal, pelo menos  $0,5 \times 10^6$  células/kg de peso corporal, pelo menos  $0,75 \times 10^6$  células/kg de peso corporal, pelo menos  $1 \times 10^6$  células/kg de peso corporal, 10 pelo menos  $1.25 \times 10^6$  células/kg de peso corporal, pelo menos  $1,5 \times 10^6$  células/kg de peso corporal, pelo menos  $1.75 \times 10^6$  células/kg de peso corporal, pelo menos  $2 \times 10^6$  células/kg de peso corporal, pelo menos  $2,5 \times 10^6$  células/kg de peso corporal, pelo menos  $3 \times 10^6$  células/kg de peso corporal, pelo menos  $4 \times 10^6$  células/kg de peso corporal, 15 pelo menos  $5 \times 10^6$  células/kg de peso corporal, pelo menos  $10 \times 10^6$  células/kg de peso corporal, pelo menos  $15 \times 10^6$  células/kg de peso corporal, pelo menos  $20 \times 10^6$  células/kg de peso corporal, pelo menos  $25 \times 10^6$  células/kg de peso corporal, ou pelo menos  $30 \times 10^6$  células/kg de peso corporal.

Sem querer se ligar a qualquer teoria particular, a presente invenção contempla, em parte, que uma das vantagens dos métodos presentes é que menos células tronco hematopoiéticas e progenitoras podem ser usadas em um transplante devido a células tronco hematopoiéticas e progenitoras melhoradas na composição terapêutica da invenção aumentaram enxerto potencial, retorno melhorado, e capacidade aumentada para expansão *in vivo* comparada às células tratadas com controle e as células tratadas com um agente a 4°C, por exemplo.

25           C.     Métodos da invenção

Os inventores analisaram diversos parâmetros biológicos das populações de células tronco hematopoiéticas e progenitoras tratadas com agentes que modificam a expressão de gene das células, incluindo os agentes que estimulam a via de prostaglandina e regulam para cima a expressão de gene e superfície celular de CXCR4, a fim de aumentar a efetividade de células tronco hematopoiéticas e progenitoras usadas em transplantes de células tronco. A efetividade da população de células na reconstituição do sistema hematopoiético de um sujeito no transplante depende de tais propriedades como a capacidade da população de células para retornar e enxertar na medula óssea, se auto-renovar, e proliferar *in vivo*. A invenção fornece um método para a modulação de uma população de células para melhorar tais propriedades celulares e fornecer melhorias terapêuticas resultantes na reconstituição hematopoiética.

O “enxerto potencial” refere-se à capacidade de uma célula em enxertar. Em moda-

lidades particulares, o enxerto potencial de uma célula tronco hematopoiética ou progenitora, como uma célula CD34<sup>+</sup>, Lin(-), pode ser determinado medindo-se, por exemplo, a atividade de vias de sinalização celular PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub>/R<sub>4</sub>, a expressão na célula dos genes associados com retorno ou enxerto, viabilidade celular, e a capacidade da célula em se auto renovar.

5 Claro, o especialista na técnica poderia apreciar outros ensaios apropriados que poderiam ainda indicar um enxerto potencial aumentado em uma célula tronco hematopoietica ou progenitora. Como usado aqui, o termo “enxerto” refere-se à capacidade de uma célula em se integrar em um local, como um tecido, e persiste no local particular ao longo do tempo, *por exemplo*, a capacidade de uma célula tronco hematopoiética ou progenitora em se integrar e 10 persistir na medula óssea. “Retornar” refere-se a capacidade das células tronco hematopoiética ou progenitoras em se localizarem, ou seja, percorrer, a uma área particular ou tecido, como localização de células tronco transplantadas para a medula óssea.

Em várias modalidades, a invenção fornece composição terapêutica compreendendo células tronco hematopoiéticas ou progenitoras humanas contatadas com um ou mais 15 agentes capazes de aumentar a expressão de gene CXCR4 nas células, incluindo agentes que estimulam a via de prostaglandina, *por exemplo*, a via de sinalização celular PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub>/R<sub>4</sub>. A composição terapêutica de células tratadas oferece várias vantagens sobre as células anteriormente usadas nos transplantes de célula tronco, como, por exemplo, retorno aumentado, enxerto e expansão da população celular *in vivo*. Como usado aqui, “agente” refere-se 20 a um agente capaz de aumentar expressão de gene CXCR4 nas células. Tais agentes incluem, por exemplo e, entre outros, PGE<sub>2</sub> ou agentes contendo atividade de dmPGE<sub>2</sub>, incluindo, entre outros, um análogo PGE<sub>2</sub>, um análogo de cAMP ou ativador, e/ou um ativador G<sub>α</sub>-s como descrito aqui em outro ponto. Em modalidades particulares, a população de células 25 compreendendo células tronco hematopoiéticas ou progenitoras pode ser contatada com 1, 2, 3, 4, 5 ou mais agentes em qualquer combinação, simultaneamente ou sequencialmente.

Células tronco hematopoiéticas ou progenitoras humanas contatadas com um 30 agente capaz de aumentar a expressão de gene CXCR4 nas células, como PGE<sub>2</sub> ou um agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub>, em condições suficientes para aumentar enxerto e/ou enxerto potencial e/ou expansão, podem ser caracterizadas em múltiplas ou várias vias, como por níveis aumentados de sinalização intracelular cAMP, *por exemplo*, fosforilação CREB, ou como determinado por um ensaio bioquímico; assinatura de expressão de genes indicando regulação para cima de genes envolvidos na via de sinalização PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub>/R<sub>4</sub>, *por exemplo*, CREM, e genes que aumentam retorno e enxerto de célula tronco hematopoiética 35 e progenitora, *por exemplo*, CXCR4, como determinado por ensaios de expressão de gene, *por exemplo*, microarranjos; nenhuma redução mensurável em viabilidade celular de célula tronco hematopoiética e progenitora como determinado por ensaios de viabilidade celular,

*por exemplo*, coloração com 7-aminoactinomicinaD (7-AAD); e/ou uma capacidade aumentada de células tronco hematopoieticas em seu auto renovar como determinado por um ensaio de unidades formadoras de colônia *in vitro* (CFU-C), por exemplo.

- Em uma modalidade, células tronco hematopoieticas ou progenitoras contatadas com um agente capaz de aumentar a expressão de gene CXCR4 nas células, como PGE<sub>2</sub> ou um agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub>, em condições suficientes para aumentar enxerto e/ou enxerto potencial e/ou expansão podem ser identificadas por avaliação da assinatura de expressão de gene das células contatadas (tratadas) comparado às células tratadas com veículo ou células tratadas com um agente a 4°C.
- Em modalidades particulares, células tronco hematopoieticas ou progenitoras tratadas que têm aumento de enxerto e/ou enxerto potencial e/ou expansão aumentada *in vivo* têm expressão aumentada de 1, 2, 3, 4, 5, ou todos os seguintes genes comparado as células tratadas com veículo ou células tratadas com um agente a 4°C: hialuronan sintase 1 (HAS1), proteína GEM de ligação a GTP (GEM), proteína fosfatase 4 de especificidade dual (DUSP4), anfiregulina (AREG), Proteína 1 relacionada a receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento responsivo de cAMP (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), antígeno 2 relacionado a Fos (FOSL2), e receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4). Em modalidades específicas da invenção, CXCR4 é regulado para cima em pelo menos quatro vezes nas células tronco hematopoieticas ou progenitoras na composição terapêutica comparada ao nível de expressão de CXCR4 em células não tratadas.

Em contraste às observações derivadas de estudos pré-clínicos, os presentes inventores descobriram que as células tronco hematopoieticas e progenitoras contatadas com um agente que estimula a via de prostaglandina aumenta a expansão e enxerto potencial das células em condições particulares descritas aqui. Estas condições otimizam a resposta biológica desejada de tratamento com um agente que estimula a via de prostaglandina, incluindo retorno de célula tronco, sobrevivência, proliferação, e enxerto.

Assim, os inventores descobriram que as condições em que se acredita haver a redução de viabilidade celular de células tronco hematopoieticas e progenitoras e reduz a meia-via de dmPGE<sub>2</sub> de modo inesperado resulta em células tronco hematopoieticas ou progenitoras que apresentam potencial aumentado para enxerto e/ou *in vivo* expansão porque preservam a viabilidade celular, aumentam o retorno e enxerto à medula óssea (*por exemplo*, expressão aumentada de CXCR4), e aumento da capacidade de se auto renovarem.

Assim, a invenção contempla novos métodos para conduzir transplantes de medula óssea, sangue periférico, e sangue de cordão umbilical, em parte, tratando as populações de células tronco hematopoieticas ou progenitoras com agentes descritos aqui que regulam para cima a expressão de CXCR4 nas células, incluindo agentes que estimulam a via de

sinalização celular PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub>/R<sub>4</sub>, como dmPGE<sub>2</sub>, em condições não esperadas como sendo favoráveis para aumentar enxerto de célula tronco hematopoietica e progenitora aumentado ou expansão *in vivo* de células tronco hematopoieticas e progenitoras.

Como usado aqui, os termos “condições suficientes,” ou “em condições suficientes,” 5 refere-se às condições de incubação para tratar a fonte de transplante material, por exemplo, células de medula óssea, células de sangue periférico, ou células de sangue de cordão, e/ou outras populações de células compreendendo células tronco hematopoieticas e/ou progenitoras, e/ou populações de células enriquecidas ou selecionadas de células tronco hematopoieticas e progenitoras, com um agente que aumenta expressão de gene CXCR4 nas 10 células. Em uma modalidade, as condições são suficientes para aumentar enxerto de células tronco hematopoieticas e progenitoras administradas a um sujeito. Em uma modalidade, as condições são suficientes para aumentar a expansão de células tronco hematopoietica ou progenitoras administrada a um sujeito. Em outra modalidade, as condições são suficientes para aumentar enxerto e expansão da população de células tronco hematopoietica ou 15 progenitoras administrada a um sujeito. Condições de incubação incluem, entre outras, fonte de células, concentração do agente, duração de incubação das células e o agente, e a temperatura de incubação. Em modalidades particulares, o agente é PGE<sub>2</sub> ou um agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub>. Em uma modalidade, o agente é 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>.

Em várias modalidades, condições suficientes para aumentar enxerto e/ou expansão das células tronco hematopoieticas ou progenitoras incluem, incubação em uma temperatura fisiologicamente relevante, como uma faixa de temperatura de cerca de 39°C (cerca de temperatura ambiente a cerca de temperatura corporal), incluindo, entre outros, às temperaturas de cerca de 22°C, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, e 39°C; em uma concentração final de cerca de 10 nM 20 a cerca de 120 µM 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>, incluindo, entre outros, a cerca de 100 nM, cerca de 500 nM, cerca de 1 µM, cerca de 10 µM, cerca de 20 µM, cerca de 30 µM, cerca de 40 µM, cerca de 50 µM, cerca de 60 µM, cerca de 70 µM, cerca de 80 µM, cerca de 90 µM, cerca de 100 µM, cerca de 110 µM, ou cerca de 120 µM, ou qualquer outra concentração interveniente de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> (*por exemplo*, 1 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM); e 25 incubação por cerca de 60 minutos a cerca de 4 horas, incluindo, entre outros, a incubação por uma duração de cerca de 60 minutos, cerca de 70 minutos, cerca de 80 minutos, cerca de 90 minutos, cerca de 100 minutos, cerca de 110 minutos, cerca de 2 horas, cerca de 2,5 horas, cerca de 3 horas, cerca de 3,5 horas ou cerca de 4 horas ou qualquer outra duração 30 interveniente de incubação (*por exemplo*, 111 minutos, 112 minutos, 113 minutos, 114 minutos, 115 minutos, 116 minutos, 117 minutos, 118 minutos, 119 minutos).

Como usado aqui, o termo “cerca de” ou “aproximadamente” significa uma concentração, temperatura, duração, quantidade, nível, valor, número, frequência, percentual, di-

mensão, tamanho, quantidade, peso ou comprimento que varia em tanto quanto 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1% a uma concentração de referência, temperatura, quantidade de duração, nível, valor, número, frequência, percentual, dimensão, tamanho, quantidade ou comprimento. Por exemplo, em modalidade preferencial, o termo cerca de refere-se a 5 uma faixa de quantidades centrada em cerca de a quantidade específica mais ou menos 10%, por exemplo, a temperatura de cerca de 37°C refere-se a uma faixa de temperatura de 33°C a 41°C. Em outra modalidade preferencial, o termo cerca de refere-se a uma faixa de quantidades centrada em cerca de a quantidade específica mais ou menos 5%. Em outra modalidade preferencial, o termo cerca de refere-se a uma faixa de quantidades centrada 10 em cerca de a quantidade específica mais ou menos 1%.

Em modalidades particulares, condições suficientes para aumentar enxerto e/ou expansão *in vivo* de células tronco hematopoiéticas e progenitoras incluem, incubação em uma faixa de temperatura de cerca de 35°C a cerca de 39°C; em uma concentração final de cerca de 10 µM a cerca de 25 µM 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>; e incubação por cerca de 1 hora a 15 cerca de 4 horas, por cerca de 2 horas a cerca de 3 horas, por cerca de 2 horas a cerca de 4 horas, ou por cerca de 3 horas a cerca de 4 horas.

Em outra modalidade, condições suficientes para aumentar enxerto e/ou expansão *in vivo* de células tronco hematopoiética ou progenitoras incluem, incubação em uma temperatura de cerca de 37°C (cerca de temperatura corporal); em uma concentração final de cerca de 10 µM ou mais 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>; e incubação por cerca de duas horas.

Em outra modalidade, contatar sangue de cordão humano, células de medula óssea, ou células de sangue periférico mobilizado compreendendo células tronco hematopoiéticas ou progenitoras ou uma população purificada de células Lin(-)CD34<sup>+</sup>, células tronco hematopoiéticas ou progenitoras com uma concentração final de 10 µM de 16,16-dmPGE<sub>2</sub> 25 (dmPGE<sub>2</sub>) por 120 minutos ou mais em uma temperatura de 37°C aumenta o potencial de enxerto de célula tronco hematopoiética ou progenitora na medula óssea de um sujeito. As células contatadas não mostram redução estatisticamente significativa em viabilidade celular, e mostram aumento estatisticamente significativo na expressão de gene associado com retorno e enxerto de célula tronco hematopoiética ou progenitora, e a capacidade de se auto 30 renovar.

Em outra modalidade, contatar sangue de cordão humano, células de medula óssea, ou células de sangue periférico mobilizado compreendendo células tronco hematopoiéticas ou progenitoras ou uma população purificada de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras Lin(-)CD34<sup>+</sup>, com uma concentração final de 10 µM de 16,16-dmPGE<sub>2</sub> 35 (dmPGE<sub>2</sub>) por 120 minutos ou mais em uma temperatura de 37 °C aumenta a expansão *in vivo* da população de célula tronco hematopoiética ou progenitora administrada a um sujeito.

Em várias modalidades, a invenção fornece, em parte, métodos para obter e prepa-

rar a população de células para um transplante de célula tronco hematopoética e progenitora, compreendendo contatar a população de células com um ou mais agentes que aumentam a expressão de gene CXCR4 nas células, incluindo agentes que estimulam a via de sinalização celular PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub> e/ou PGE<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, em condições suficientes para aumentar enxerto 5 potencial e/ou enxerto das células.

Em modalidades particulares, a invenção fornece, em parte, métodos para obter e preparar a população de células para aumentar a quantidade de células tronco hematopoéticas e progenitoras em um sujeito, compreendendo contatar a população de células com um ou mais agentes que aumentam a expressão de gene CXCR4 nas células, incluindo 10 agentes que estimulam a via de sinalização celular PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub> e/ou PGE<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, em condições suficientes para aumentar a expansão da população de células *in vivo*.

Em várias outras modalidades, a invenção fornece, em parte, um método para aumentar enxerto de célula tronco hematopoética e progenitora em um sujeito compreendendo contatar a população de células que compreende células hematopoieticas que expressam 15 CD34 mas que são desprovidas da expressão de Lin (*por exemplo*, células Lin(-)CD34<sup>+</sup>), com um ou mais agentes selecionados do grupo que consiste de: uma prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) ou um agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub>, e administrar a população de células a um sujeito. As células são contatadas com o agente em condições suficientes para aumentar o enxerto das células tronco hematopoéticas e progenitoras contatadas no sujeito 20 como descrito em outro ponto aqui.

Em certas modalidades, a invenção fornece, em parte, um método de expansão da população de célula tronco hematopoética e progenitora em um sujeito, *in vivo*, compreendendo contatar a população de células que compreendem células hematopoieticas que expressam CD34 mas que são desprovidas na expressão de lin (*por exemplo*, células Lin(-)CD34<sup>+</sup>), com um ou mais agentes selecionados do grupo que consiste de: uma prostaglandina E2 (PGE2) ou um agente contendo atividade dmPGE2, e administrar a população de células a um sujeito. As células são contatadas com o agente em condições suficientes para expandir a população de células tronco hematopoéticas e progenitoras contatadas no sujeito 25 como descrito em outro ponto aqui.

30 A invenção contempla, em parte, métodos para aumentar enxerto de célula tronco em um sujeito em necessidade do mesmo (*por exemplo*, um humano) compreendendo contatar a população de células que compreende células tronco hematopoieticas e/ou progenitoras (*por exemplo*, células de medula óssea, sangue periférico células, e/ou células de sangue de cordão umbilical) com PGE<sub>2</sub> ou um análogo do mesmo, *por exemplo*, 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> (dmPGE<sub>2</sub>) ou um agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub> e administrar as células 35 ao sujeito. Em uma modalidade, a fonte de células compreendendo células tronco hematopoieticas e/ou progenitoras é contatada com um análogo de PGE<sub>2</sub> como dmPGE<sub>2</sub>. Em várias

modalidades, a fonte de células compreendendo células tronco hematopoieticas e/ou progenitoras é contatada com um agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub> como dmPGE<sub>2</sub>, um análogo de cAMP ou melhorador, ou um ativador G $\alpha$ -s.

Em uma determinada modalidade, a população de células compreendendo células tronco hematopoieticas e/ou progenitoras é contatada com um análogo de PGE<sub>2</sub> como dmPGE<sub>2</sub> e um agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub>, *por exemplo*, um análogo de cAMP ou melhorador, ou um ativador G $\alpha$ -s. Em outra modalidade, a fonte de células compreendendo células tronco hematopoieticas e/ou progenitoras é contatada com um ou mais análogos PGE<sub>2</sub>, um ou mais análogos cAMP ou melhorados, e/ou um ou mais ativadores G $\alpha$ -s.

Em várias outras modalidades, a invenção fornece métodos para tratar um sujeito em necessidade do mesmo que compreende identificar um sujeito em necessidade, e administrar ao sujeito uma população de células que compreende células tronco hematopoieticas e/ou progenitoras contatadas com um ou mais agentes selecionados do grupo que consiste de: uma prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), um agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub>, *por exemplo*, um análogo de cAMP ou melhorador, e um ativador G $\alpha$ -s em condições suficientes para aumentar o enxerto ou expansão *in vivo* das células tronco hematopoieticas ou progenitoras contatadas em um sujeito, assim, tratando o sujeito em necessidade.

Por “melhorar” ou “promover,” ou “aumentar” ou “ativar” refere-se geralmente à capacidade de PGE<sub>2</sub> ou um agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub> para produzir ou causar uma maior resposta fisiológica (*ou seja*, efeitos a jusante) em uma célula, comparado à resposta causada por veículo ou uma molécula/composição de controle, *por exemplo*, *aumento de* enxerto/enxerto potencial de células tronco e/ou progenitoras e expansão aumentada *in vivo* de célula tronco. Uma resposta fisiológica mensurável pode incluir um enxerto de célula tronco hematopoietica e/ou progenitora, viabilidade, retorno, auto-renovação, e/ou expansão, entre outros aparentes a partir do entendimento na técnica e a descrição aqui. Em uma modalidade, o aumento pode ser um aumento na expressão de gene como um resultado de sinalização aumentada através das vias de sinalização celulares PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub> e/ou PGE<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, incluindo, entre outros, a um aumento na fosforilação CREB, um aumento em expressão de CREM, e um aumento em CXCR4. Aumento em enxerto de célula tronco hematopoietica e/ou progenitora, viabilidade, retorno, auto-renovação e/ou expansão *in vivo*, pode ainda ser apurado usando métodos conhecidos na técnica, como expressão de gene, ensaios de CFU-C, ensaios de CFU-S, ensaios CAFC, e expressão de proteína de superfície celular, entre outros. Uma quantidade “aumentada” ou “melhorada” é tipicamente uma quantidade “estatisticamente significativa”, e pode incluir um aumento que é 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 ou mais vezes (*por exemplo*, 500, 1000 vezes) (incluindo todos os inteiros e pontos decimais entre e acima de 1, *por exemplo*, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) a resposta produzida por veículo (a ausência de um agente) ou uma composição de controle. Por

exemplo, em modalidades particulares, métodos da invenção compreendem contar a população de células compreendendo células tronco hematopoiéticas ou progenitoras com dmPGE<sub>2</sub> em cerca de 37°C. Estas células têm um potencial de enxerto aumentado e expansão comparado às células contatadas em cerca de 4°C.

5 Por “reduzir” ou “baixar,” ou “diminuir,” ou “abaixar,” ou “abater” refere-se geralmente à capacidade de uma PGE<sub>2</sub> ou um agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub> de produzir ou causar uma menor resposta fisiológica (*ou seja*, efeitos a jusante) em uma célula, comparado à resposta causada por veículo ou uma molécula/composição de controle, *por exemplo*, apoptose reduzida. Em uma modalidade, a redução pode ser uma redução em expressão de 10 gene ou uma redução em sinalização celular que normalmente é associada com uma redução de viabilidade celular. Uma quantidade “diminuída” ou “reduzida” é tipicamente uma quantidade “estatisticamente significativa”, e pode incluir uma redução que é 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 ou mais vezes (*por exemplo*, 500, 1000 vezes) (incluindo todos os inteiros e pontos decimais entre e acima de 1, *por exemplo*, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) 15 a resposta produzida por veículo (a ausência de um agente) ou uma composição de controle. Por exemplo, em modalidades particulares, métodos da invenção compreendem contar a população de células compreendendo células tronco hematopoiéticas ou progenitoras com dmPGE<sub>2</sub> em cerca de 37°C. As células contatadas não apresentam uma redução estatisticamente significativa em viabilidade celular comparado às células contatadas com dmPGE<sub>2</sub> 20 em cerca de 4°C.

Por “manter,” ou “preservar,” ou “manutenção,” ou “nenhuma alteração,” ou “nenhuma alteração substancial,” ou “nenhuma redução substancial” refere-se geralmente à capacidade de um PGE<sub>2</sub> ou um agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub> em produzir ou causar uma resposta fisiológica comparável (*ou seja*, efeitos a jusante) em uma célula, comparado 25 à resposta causada por veículo ou uma molécula/composição de controle (resposta de referência). Uma resposta comparável é aquela que não significativamente diferente ou mensuravelmente diferente a partir da resposta de referência (ver Figura 13A). Em uma modalidade, a população de células compreendendo células tronco hematopoiéticas e progenitoras é contatada com um agente que estimula as vias de sinalização celular PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub> e/ou PGE<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, 30 como um agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub>, *por exemplo*, dmPGE<sub>2</sub>, um análogo de cAMP ou melhorador, e um ativador Gα-s em cerca de 37°C por cerca de duas horas. As células tratadas não apresentam redução estatisticamente significativa na viabilidade celular comparada às células contatadas em cerca de 4°C. Em outras palavras, os métodos descritos aqui mantêm, não substancialmente reduzem, não resultam em redução estatisticamente significativa em, não causam uma perda de, e/ou não alteram substancialmente viabilidade celular 35 de células tronco hematopoiéticas e progenitoras comparado às células contatadas em cerca de 4°C.

Em modalidades particulares, as células são tratadas com um agente, *por exemplo*, dmPGE<sub>2</sub> por um período de tempo. Em modalidades relacionadas, as células são lavadas após tratamento em um meio de cultura de célula de modo que são are substancialmente isentos do agente. Por exemplo, em uma modalidade, a população de células compreendendo células tronco hematopoiéticas ou progenitoras humanas, *por exemplo*, células de medula óssea, células de sangue periférico mobilizado, ou células de sangue de cordão umbilical são contatadas com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> por um período de 120 minutos em cerca de 37°C. Após a incubação, mas antes da infusão ou tratamento subsequente ou armazenamento, as células são lavadas com um meio de cultura de célula, como dextrano de baixo peso molecular com 5% de meio de albumina sérica humana (LMD/5% HSA) ou meio Stem Span (Stem Cells Technology Inc.).

Em várias modalidades ilustrativas, a invenção fornece, em parte, métodos de tratamento *in vitro* ou *ex vivo* compreendendo contatar a população de células compreendendo células tronco hematopoiéticas ou progenitoras com PGE<sub>2</sub> ou um agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub> que mantém viabilidade celular de células tronco/progenitoras, e aumenta enxerto, retorno, auto-renovação, e expansão *in vivo*.

O termo “*ex vivo*” refere-se geralmente às atividades que ocorrem fora de um organismo, como experimentação ou medições realizadas em ou nos tecidos vivos em um ambiente artificial fora do organismo, preferencialmente com alteração mínima das condições naturais. Em modalidades particulares, procedimentos “*ex vivo*” envolvem células vivas ou tecidos retirados de um organismo e cultivados em aparelhos de laboratório, geralmente em condições estéreis, e tipicamente por algumas horas ou até cerca de 24 horas, mas incluindo, até 48 ou 72 horas, dependendo das circunstâncias. Em certas modalidades, tais tecidos ou células podem ser coletadas e congeladas e posteriormente congeladas para tratamento *ex vivo*. Experimentos de cultura de tecido ou procedimentos durando mais tempo do que alguns dias usando células vivas ou tecido são tipicamente considerados como sendo “*in vitro*,” embora em certas modalidades, este termo pode ser usados de modo intercambiável com *ex vivo*.

As menções à “administração *ex vivo*,” “tratamento *ex vivo*,” ou “uso terapêutico *ex vivo*,” refere-se geralmente a procedimentos médicos em que um ou mais órgãos, células, ou tecidos são obtidos a partir de um sujeito vivo ou recentemente falecido, opcionalmente purificado/enriquecido, exposto a um tratamento ou procedimento (*por exemplo*, uma etapa de administração *ex vivo* que envolve incubar as células com uma composição ou agente da presente invenção para aumentar a expansão de células desejáveis, como células tronco hematopoiéticas ou progenitoras). As células tratadas *ex vivo* podem ser administradas ao mesmo sujeito vivo ou diferente.

Tais pedidos terapêuticos *ex vivo* podem ainda incluir um tratamento opcional *in vi-*

vo ou etapa procedural, como administrar células contatadas da invenção uma ou mais vezes ao sujeito vivo. Ambas administração local e sistêmica são contempladas para estas modalidades, de acordo com técnicas bem conhecidas na técnica e como descrito em outro ponto aqui. A quantidade de células administrada a um sujeito irá depender das características do sujeito, como saúde geral, idade, sexo, peso corporal, e tolerância à drogas, bem como o grau, gravidade, e tipo de reação à droga e/ou transplante celular.

O termo “*in vivo*” refere-se geralmente às atividades que ocorrem dentro de um organismo, como enxerto de célula, retorno de célula, auto-renovação de células, e expansão de células. Em uma modalidade, o termo “expansão *in vivo*” refere-se à capacidade de uma 10 população celular em aumentar em número *in vivo*. Em modalidades particulares, a expansão *in vivo* inclui auto-renovação e/ou proliferação de células tronco.

Em uma modalidade, a invenção fornece, em parte, método para preparar a população de células, *por exemplo*, células de medula óssea, células de sangue periférico mobiliizado, células de sangue de cordão umbilical, para um transplante, *por exemplo*, transplante 15 de medula óssea que compreende contatar as células *ex vivo*, com dmPGE<sub>2</sub> ou um agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub> em uma temperatura e por um tempo suficiente para aumentar o enxerto e/ou expansão *in vivo* das células contatadas quando administrada a um sujeito.

Em uma modalidade particular, a invenção fornece um método de tratar um sujeito em necessidade de reconstituição hematopoiética ou reconstituição do sistema hematopoiético 20 compreendendo identificar um sujeito em necessidade de reconstituição hematopoiética, e administrar ao sujeito uma quantidade de células tronco hematopoiéticas e/ou progenitoras contatadas com um agente capaz de aumentar expressão do gene CXCR4, como dmPGE<sub>2</sub>, em condições suficientes para aumentar o enxerto das células tronco hematopoiéticas e progenitoras contatadas no sujeito, assim, tratando o sujeito em necessidade de reconstituição hematopoiética.

Em outra modalidade particular, a invenção fornece um método para tratar um sujeito em necessidade de reconstituição hematopoiética, reconstituição do sistema hematopoiético, um número aumentado de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras, e/ou expansão *in vivo* de células tronco hematopoiética ou progenitoras compreendendo identificar um sujeito em necessidade de reconstituição hematopoiética, e administrar ao sujeito 30 uma quantidade de células tronco hematopoiética ou progenitoras contatadas com um agente que aumenta expressão de gene CXCR4, como dmPGE<sub>2</sub> em condições suficientes para aumentar a expansão *in vivo* das células tronco hematopoiéticas ou progenitoras contatadas no sujeito, assim tratando o sujeito em necessidade de reconstituição hematopoiética.

35 Um “sujeito,” como usado aqui, inclui qualquer animal que apresenta um sintoma que pode ser tratado com um agente ou composição ou dispositivo da invenção, ou pode ser tratado com HSCs ou sangue de cordão que foi tratado *ex vivo* com um agente ou com-

posição da invenção. “Sujeitos em necessidade” de reconstituição hematopoiética, reconstituição do sistema hematopoiético, um número aumentado de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras, e/ou expansão *in vivo* de células tronco hematopoiética ou progenitoras inclui, entre outros que estão ou foram diagnosticados com vários tipos de leucemias, anemias, linfomas, mielomas, distúrbios de deficiência imune, e tumores sólidos como descrito em outro ponto aqui. Um “sujeito” ainda inclui um humano que é um candidato para transplante de célula tronco ou transplante de medula óssea, como durante o curso de tratamento para uma doença maligna ou um componente de terapia gênica. Sujeitos podem ainda incluir indivíduos ou animais que doam células tronco ou medula óssea para transplante alógênico. Em certas modalidades, um sujeito pode passar por radioterapia ou quimioterapia, como durante vários tratamentos de câncer. Sujeitos apropriados (*por exemplo*, pacientes) incluem animais de laboratório (*por exemplo*, camundongo, rato, coelho, ou cobaia), animais de fazenda, e animais domésticos ou de estimação (*por exemplo*, um gato ou cachorro). Primatas não humanos e, preferencialmente, pacientes não humanos são incluídos. Sujeitos típicos incluem animais que apresentam quantidades anormais (quantidades inferiores ou superiores do que o sujeito “normal” ou “saudável”) de uma ou mais atividades fisiológicas que podem ser moduladas por um agente ou um transplante de célula tronco ou medula óssea.

Métodos apropriados para administrar populações de células usadas nos métodos descritos aqui incluem administração parenteral, incluindo, entre outros, métodos para administração intravascular, como administração intravenosa e intraarterial. Outros métodos ilustrativos para administrar células da invenção incluem injeção e infusão intramuscular, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradermal, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal e intrasternal.

Administração de uma “quantidade” de células tronco hematopoiéticas e progenitoras a um sujeito refere-se à administração de “uma quantidade efetiva,” para obter o resultado terapêutico ou profilático desejado, incluindo, entre outros, tratamento do sujeito. Uma “quantidade terapeuticamente efetiva” de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras para a finalidade aqui é então determinada por tais considerações como são conhecidas na técnica, e pode variar de acordo com os fatores como o estado da doença, idade, sexo, e peso do indivíduo, e a capacidade das células tronco hematopoiéticas e progenitoras para induzir uma resposta desejada no indivíduo. O termo “quantidade terapeuticamente efetiva” inclui uma quantidade que é efetiva para “tratar” um sujeito (*por exemplo*, um paciente). Uma quantidade terapeuticamente efetiva é ainda uma em que qualquer efeito detratamental ou tóxico das células tronco hematopoiéticas ou progenitoras são compensados pelos efeitos terapêuticos benéficos.

Uma “quantidade terapeuticamente efetiva” refere-se a uma quantidade de células tronco hematopoiética ou progenitoras efetivas para atingir o resultado profilático desejado. Tipicamente, mas não necessariamente, uma vez uma dose profilática é usada em sujeitos antes de ou em um estágio anterior da doença, a quantidade profilaticamente efetiva é menor do que a quantidade terapeuticamente efetiva.

Em outra modalidade particular, a invenção contempla um método de tratar um sujeito em necessidade de um transplante de célula tronco hematopoiética /progenitora que compreende: selecionar o sujeito em necessidade de um transplante de célula tronco hematopoiética/progenitora e administrar a um sujeito, a população de células contatada *ex vivo* com dmPGE<sub>2</sub> ou um agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub> em uma temperatura e por um tempo suficiente para aumentar o enxerto e/ou expansão *in vivo* das células contatadas em um sujeito comparado às células não contatadas. Em modalidades particulares, o sujeito é em necessidade de reconstituição hematopoiética.

Como usado aqui, os termos “tratamento,” “tratar,” e semelhantes, refere-se a obtenção de um efeito desejado farmacológico e/ou fisiológico, incluindo, entre outros, obter uma melhora ou eliminação de sintomas de uma doença. O efeito pode ser profilático em termos de completamente ou parcialmente prevenir uma doença ou sintoma do mesmo e/ou pode ser terapêutico em termos de atingir uma melhora ou eliminação dos sintomas, ou fornecer uma cura completa ou parcial para uma doença e/ou efeito adverso atribuível à doença. “Tratamento,” como usado aqui, cobre qualquer tratamento de uma doença em um mamífero, particularmente em um humano, e inclui: (a) prevenir a doença de ocorrer em um sujeito que pode ser predisposto à doença mas ainda não foi diagnosticado como tendo esta; (b) inibir a doença, *ou seja*, interromper seu desenvolvimento; (c) aliviar a doença, *por exemplo*, causar regressão da doença, *por exemplo*, completamente ou parcialmente eliminar sintomas da doença; e (d) restabelecer o indivíduo a um estado de pré-doença, *por exemplo*, reconstituir o sistema hematopoiético.

“Tratamento” ou “tratar,” como usado aqui, inclui qualquer efeito desejável nos sintomas ou patologia de uma doença ou condição patológica, e pode incluir ainda reduções mínimas em um ou mais marcadores mensuráveis da doença ou condição sendo tratada. “Tratamento” não necessariamente indica completa erradicação ou cura da doença ou condição, ou sintomas associados a esta. Em métodos particulares da invenção, tratamento ou tratar fornece melhor enxerto de uma população de células em um sujeito, reconstituição hematopoiética melhorada em um sujeito, ou sobrevida melhorada em um sujeito.

Sujeitos em necessidade deste tipo de tratamento incluem sujeitos que sofrem de (*por exemplo*, afligidos com) distúrbios do sangue não malignos, particularmente immunodeficiências (*por exemplo* SCID, anemia Fanconi, anemia aplástica grave, ou hemoglobinopatias congênitas, ou doenças de armazenamento metabólico, como doença de Hurler, doença

de Hunter, mannosidoses, entre outras) ou câncer, particularmente malignidades hematológicas, como leucemia aguda, leucemia crônica (mieloide ou linfoide), linfoma (doença de Hodgkin ou não Hodgkin), mieloma múltiplo, síndrome mielodisplástica, ou cânceres não hematológicos como carcinoma de mama, carcinoma de cólon, neuroblastoma, ou carcinoma de célula renal.

Os métodos da invenção podem ser usados para tratar qualquer doença ou distúrbio em que é desejável aumentar a quantidade de células tronco hematopoiética ou progenitoras na medula óssea ou mobilizam células tronco hematopoiéticas ou progenitoras à medula óssea. Por exemplo, métodos da invenção podem ser usados para tratar pacientes que requerem transplante de medula óssea ou um transplante de célula tronco hematopoiética ou progenitora, como pacientes com câncer que passam por quimioterapia e/ou radioterapia. Métodos da presente invenção são particularmente úteis no tratamento de pacientes que passam por quimioterapia ou radioterapia para câncer, incluindo pacientes que sofrem de mieloma, linfoma não Hodgkin, Linfoma de Hodgkin, leucemia, e tumores sólidos (câncer de mama, câncer ovariano, câncer cerebral, câncer de próstata, câncer pulmonar, câncer de cólon, câncer de pele, câncer hepático, ou câncer pancreático). Métodos da presente invenção podem ainda ser usados no tratamento de pacientes que sofrem de anemia aplástica, um distúrbio imune (síndrome de imunodeficiência ou lúpus combinado grave), mielodisplasia, talassemia, doenças de célula em foice ou Síndrome de Wiskott-Aldrich. Os distúrbios tratados por métodos da invenção podem ser o resultado de um efeito colateral indesejado ou complicações de outro tratamento primário, como radioterapia, quimioterapia, ou tratamento com uma droga supressora de medula óssea, como zidovudina, cloranfenical ou ganciclovir. Tais distúrbios incluem neutropenias, anemias, trombocitopenia, e disfunção imune. Além disso, métodos da invenção podem ser usados para tratar dano à medula óssea causado por exposição não intencional aos agentes tóxicos ou radiação.

O distúrbio a ser tratado pode ainda ser o resultado de uma infecção (*por exemplo, infecção viral, infecção bacteriana ou infecção fúngica*) causando dano às células tronco ou progenitoras da medula óssea.

Além do acima descrito, outros condições que podem ser benéficas do tratamento usando métodos da invenção incluem, entre outros, linfocitopenia, linforreia, linfostase, eritrocitopenia, distúrbios eritrodegenerativos, eritroblastopenia, leucoeritroblastose; eritroclase, talassemia, mielofibrose, trombocitopenia, coagulação intravascular disseminada (DIC), púrpura trombocitopênica imune (autoimune) (ITP), ITP induzida por HIV, mielodisplasia; doença trombocitótica, trombocitose, neutropenias congênitas (como síndrome de Kostmann e síndrome de Schwachman-Diamond), neutropenias associadas a neoplasias, neutropenia cíclica da criança e do adulto; neutropenia pós infecção; síndrome mielodisplástica; neutropenia associada com quimioterapia e radioterapia; doença granulomatosa crônica; muco-

polisacaridoses; Diamond Blackfan; Doença de célula pilosa; ou talassemia beta maior.

Em uma modalidade particular, o paciente em necessidade de um transplante é um doador de uma medula óssea que doou medula óssea, é um doador de a medula óssea que irá doar a medula óssea, é um receptor de um transplante de medula óssea de um doador, 5 tem células progenitoras hematopoiéticas em estresse ambiental, tem anemia, tem um nível reduzido de função de célula imune comparado a um sujeito normal, ou tem uma deficiência de sistema imune.

Em certa modalidade, o paciente em necessidade de um transplante tem mieloma, linfoma não Hodgkin, Linfoma de Hodgkin, leucemia mieloide crônica, leucemia mielogênica 10 crônica, leucemia granulocítica crônica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia não linfoblástica aguda, ou pré-leucemia.

D. Agentes Usados nos Métodos da invenção

Em várias modalidades, a invenção contempla composição terapêutica da população de células compreendendo células tronco hematopoiéticas ou progenitoras contatadas 15 com um ou mais agentes que aumentam expressão de gene CXCR4 nas células, como agentes que estimulam as vias de sinalização celular PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub> e/ou PGE2R4.

Usando práticas cGMP, agentes úteis na preparação da composição terapêutica da invenção podem ser formulados em um solvente orgânico, como acetato de metil, para uso em contatar as células da invenção, e podem ser fornecidos em um vaso isento de endotoxina. Agentes contemplados pela invenção são apropriados para administração *ex vivo* às 20 células mamíferas, como d escrito. Em certas modalidades, o solvente é tipicamente um solvente orgânico apropriado, como descrito aqui (*por exemplo*, DMSO, DMF, DME, etc., incluindo combinações ou misturas dos mesmos). Um ou mais solventes podem ser combinados em certas proporções. Por exemplo, uma mistura de dois solventes pode ser combinada em uma razão de 9,5:0,5, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, etc., incluindo todos os inteiros e 25 pontos decimais.

A menção à “solvente orgânico” ou “solvente orgânico apropriado” refere-se geralmente a carbono contendo líquidos ou gases que dissolvem um soluto sólido, líquido, ou gasoso, resultando em uma solução. Um solvente orgânico “apropriado” é aquele que é 30 apropriado para administração *ex vivo* a, ou incubação com, células mamíferas, e pode ainda ser apropriado para administração *in vivo* a um sujeito, como contendo toxicidade mínima ou outros efeitos inibitórios sob condições *ex vivo* (*por exemplo*, cultura de célula) ou *in vivo* em uma concentração selecionada para o tempo de incubação ou administração. Um solvente orgânico apropriado deve ainda ser apropriado para estabilidade de armazenamento e 35 manuseio dos agentes descritos aqui. Exemplos de solventes orgânicos apropriados incluem, entre outros, dimetil sulfóxido (DMSO), N, N-dimetilformamida (DMF), dimetoxietano (DME), e dimetilacetamida, incluindo misturas ou combinações dos mesmos. Em certas mo-

dalidades, uma composição ou solvente orgânico é “substancialmente livre” de metil acetato, significando que não deve haver mais do que quantidades traços de metil acetato na composição ou solvente, e preferencialmente quantidades indetectáveis (*por exemplo*, como medido por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), cromatografia gasosa (GC), etc.).

- 5        Como usado aqui, o termo “livre de endotoxina” refere-se aos vasos e/ou composições que contêm no máximo quantidades traços (*ou seja*, quantidades contendo nenhum efeito fisiológico adverso a um sujeito) de endotoxina, e preferencialmente quantidades indetectáveis de endotoxina. Por “substancialmente livre de endotoxina” entende-se que há menos endotoxina por dose de células que é permitido pelo FDA para um produto biológico, 10 que é uma endotoxina total de 5 EU/kg de peso corporal por dia, que para uma pessoa média de 70 kg é 350 EU por dose total de células. Em uma modalidade, o termo “livre de endotoxina” refere-se a um vaso e/ou composições que é pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% livre de endotoxina. Endotoxinas são toxinas associadas com certas bactérias, tipicamente bactéria gram-negativa, embora endotoxinas podem ser encontradas em bactérias gram-positivas, como *Listeria monocytogenes*. As endotoxinas mais prevalentes são lipopolissacarídeos (LPS) ou lipooligossacarídeos (LOS) encontrados na membrana externa de várias bactérias Gram-negativas, e que representam uma característica patogênica central na capacidade de estas bactérias em causar doença. Pequenas quantidades de endotoxina em humanos pode produzir febre, 20 uma redução na pressão arterial, e ativação de inflamação e coagulação, entre outros efeitos fisiológicos adversos. Portanto, é frequentemente desejável remover a maior parte ou todos os traços de endotoxina a partir de recipientes de produto de droga, porque mesmo pequenas quantidades podem causar eventos adversos em humanos. Endotoxinas podem ser removidas a partir de vasos usando métodos conhecidos na técnica, por exemplo, vasos 25 podem ser limpos em equipamentos de lavagem com filtro HEPA com água sem endotoxina, despirogenada a 250°C, e embaladas limpas em estações de trabalho com filtro HEPA localizados dentro de uma área limpa de classe 100/10 (*por exemplo*, uma área limpa classe 100, contém não mais do que 100 partículas maiores do que metade de um micron em um pé cúbico de ar).
- 30        Como usado aqui, o termo “boas práticas de fabricação (GMP)” refere-se ao controle e gerenciamento de produção, e teste de controle de qualidade, de alimentos, produtos farmacêuticos, e dispositivos médicos. GMP não necessariamente confia na amostragem, mas por outro lado confia em documentação de cada aspecto do processo, atividades, e operações envolvidas com fabricação de dispositivo médico e drogas. Se a documentação 35 mostra como o produto foi preparado e testado (o que permite rastreabilidade e, no caso de problemas futuros, retirada do mercado) não está correta e em ordem, então o produto não atinge a especificação requerida e é considerado contaminado (*ou seja*, adulterado nos

EUA). Além disso, GMP tipicamente requer que todo equipamento de fabricação e testagem seja qualificado conforme apropriado para uso, e que todas as metodologias operacionais e procedimentos (*por exemplo*, fabricação, limpeza, e teste analítico) utilizados no processo de fabricação de drogas tenham sido validados de acordo com especificações predeterminadas para demonstrar que podem realizar suas funções supostas. Nos EUA, a frase “boas práticas de fabricação atuais” aparece em 501(B) de 1938 Food, Drug, e Cosmetic Act (21 U.S.C. § 351).

Agentes que podem ser usados na preparação da composição terapêutica da invenção são agentes capazes de melhorar um retorno e enxerto potencial de populações de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras humanas. Tais agentes incluem agentes que aumentam expressão de gene CXCR4 nas células, incluindo, agentes que estimula as vias de sinalização celular PGE2R2 e/ou PGE2R4. Agentes úteis incluem, entre outros, PGE<sub>2</sub> e agentes que têm atividade dmPGE<sub>2</sub>, *por exemplo*, análogos PGE<sub>2</sub>, análogos cAMP ou melhorados, e ativadores de Gα-s. Em certas modalidades, análogos específicos PGE<sub>2</sub>R<sub>4</sub> são de particular interesse, e em algumas modalidades, o agente preferencialmente se liga e ativa um receptor PGE<sub>2</sub> E<sub>4</sub>.

Como usado aqui, os termos “prostaglandina E<sub>2</sub>” ou “PGE<sub>2</sub>” incluem, entre outros, qualquer molécula PGE<sub>2</sub> de ocorrência natural ou quimicamente sintetizada, bem como “análogos” das mesmas. Como usado aqui, o termo “análogo” ou refere-se a uma molécula química que é semelhante a outra substância química, *por exemplo*, PGE<sub>2</sub>, em estrutura e função, geralmente diferindo estruturalmente por um único elemento, mas pode diferir por modificação de mais do que um grupo (*por exemplo*, 2, 3, ou 4 grupos) se este retém a mesma função que o produto químico relacionado. Tais modificações são rotineiras aos especialistas na técnica, e incluem, por exemplo, frações químicas adicionais ou substituídas, como ésteres ou amidas de um ácido, grupos de proteção como um grupo benzil para um álcool ou tiol, e grupos tert-butoxilcarbonil para uma amina. Ainda estão incluídas as modificações em cadeias laterais de alquil, como substituições alquil (*por exemplo*, metil, dimetil, etil, etc.), modificações em nível de saturação ou insaturação de cadeias laterais, e a adição de grupos modificados como fenil substituído e fenoxi. Análogos podem ainda incluir conjugados, como frações biotina ou avidina, enzimas como peroxidase de rabano silvestre e semelhantes, e incluindo frações radio-marcadas, bioluminescentes, quimioluminescentes, ou fluorescentes. Ainda, frações podem ser adicionadas aos agentes descritos aqui para alterar suas propriedades farmacocinéticas, como para aumentar meia-vida *in vivo* ou *ex vivo*, ou para aumentar suas propriedades de penetração, entre outras propriedades desejáveis. Ainda são incluídas pró-drogas, que são conhecidos por aumentar várias qualidades desejáveis de produtos farmacêuticos (*por exemplo*, solubilidade, biodisponibilidade, fabricação, etc.) (ver, *por exemplo*, WO/2006/047476 para exemplos de pró-drogas agonistas

EP, que é incorporada por referência para sua revelação de tais agonistas).

Exemplos ilustrativos de “análogos” PGE<sub>2</sub> e agentes que têm atividade dmPGE<sub>2</sub> incluem, entre outros, 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> (dmPGE<sub>2</sub>), 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> p-(p-acetamidobenzamido) fenil éster, 11-deoxi-16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>, 9-deoxi-9-metileno-16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>, 9-deoxi-9-metileno PGE<sub>2</sub>, 9-ceto Fluprostenol, 5-trans PGE<sub>2</sub>, 17-fenil-omega-trinor PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> serinol amida, PGE<sub>2</sub> metil éster, 16-fenil tetranor PGE<sub>2</sub>, 15(S)-15-metil PGE<sub>2</sub>, 15(R)-15-metil PGE<sub>2</sub>, 8-iso-15-ceto PGE<sub>2</sub>, 8-iso PGE<sub>2</sub> isopropil éster, 20-hidroxi PGE<sub>2</sub>, 11-deoxi PGE1, nocloprost, sulprostone, butaprost, 15-ceto PGE<sub>2</sub>, e 19 (R) hidroxii PGE<sub>2</sub>. Ainda estão incluídos análogos de PG ou derivados contendo uma estrutura semelhante a PGE<sub>2</sub> que são substituídas com halogênio na posição 9 (ver, *por exemplo*, WO 2001/12596, aqui incorporado por referência em sua totalidade), vem como 2-decarboxi-2-fosfinico derivados de prostaglandina, como aqueles descritos na publicação U.S. No. 2006/0247214, aqui incorporado por referência em sua totalidade).

15 análogos de PGE1, incluindo, entre outros, alprostadil, podem ainda ser usados para ativar as vias de sinalização celular PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub> (EP<sub>2</sub>) e PGE<sub>2</sub>R<sub>4</sub> (EP<sub>4</sub>), e são contemplados como agentes úteis nos métodos da invenção.

20 A estimulação/ativação de vias de sinalização celular PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub> (EP<sub>2</sub>) e PGE<sub>2</sub>R<sub>4</sub> (EP<sub>4</sub>) são contempladas para estar sujeitas às respostas fisiológicas em células tronco hematopoieticas e progenitoras que aumentam enxerto, manutenção, viabilidade celular, e aumenta 25 retorno e proliferação das células. Assim, em uma modalidade, um “ligante a base de não PGE<sub>2</sub>” que se liga a e estimula receptores PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>R<sub>4</sub> (*ou seja*, um agonista PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub>/PGE<sub>2</sub>R<sub>4</sub>) é contemplado para uso nos métodos da presente invenção.

Exemplos ilustrativos de agonistas de receptor EP<sub>2</sub> a base de não PGE<sub>2</sub> incluem 25 CAY10399, ONO\_8815Ly, ONO-AE1-259, CP-533, 536 e carbazoles e fluorenes revelados em WO 2007/071456.

Exemplos ilustrativos de agonistas EP<sub>2</sub> a base de não PGE<sub>2</sub> incluem ONO-4819, APS-999 Na, AH23848, ONO-AE1-329, e outros agonistas EP<sub>4</sub> a base de não PGE<sub>2</sub> revelados em WO/2000/038663; patente U.S. No. 6.747.037; e patente U.S. No. 6.610.719).

30 Agentes seletivos para o receptor PGE<sub>2</sub> EP<sub>4</sub> preferencialmente se ligam aos receptores PGE<sub>2</sub> EP<sub>4</sub>. Tais agentes têm uma maior afinidade para o receptor EP<sub>4</sub> do que qualquer um dos outros três receptores EP chamados EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub> e EP<sub>3</sub>. Agentes que seletivamente se ligam ao receptor PGE EP<sub>4</sub> incluem, entre outros, agentes selecionados do grupo que consiste de: 5-[(1E, 3R)-4, 4-difluoro-3-hidroxi-4-fenil-l-buten-1-il]-l-[ 6-(2H-tetrazol- 5R-il)hexil]-2-pirrolidinone; 2-[3-[(1R, 2S, 3R)-3-hidroxi-2-[(E,3S)-3-hidroxi-5-[2-(metoximetil)fenil]pent-1-enil]-5-oxociclopentilsulfanilpropilsulfanil] ácido acético; metil 4-[2-[(1R, 2R, 3R)-3-hidroxi-2-[(E,3S)-3-hidroxi-4-[3-(metoximetil)fenil]but-1-enil]-5-oxociclopentil]etilsulfanil]butanoato; 16-35 (3-Metoximetil)fenil-ro-tetranor-5-tiaPGE; 5-{3-[(2S)-2-((3R)-3-hidroxi-4-[3-

5 (trifluorometil)fenil]butil}-5-oxopirrolidin-1-il]propil]tiofeno-2-carboxilato; ácido [4-[3-butil-5-oxo-1-(2-trifluorometil-fenil)-1,5-dihidro-[1,2,4]triazol-4-ilmetil]-bifenil-2-sulfônico (3-metil-tiofeno-2-carbonil)- amida]; e ácido ((Z)-7-{(IR, 4S, 5R)-5-[(E)-5-(3-chloro-benzo[b]tiofeno-2-il)-3-hidroxi-pent-1-enil]-4-hidroxi-3, 3-dimetil-2-oxo-ciclopentil}-hept-5-enoico), e sais farmaceuticamente aceitáveis de qualquer um destes agentes.

10 Um “melhorador AMP cíclico (cAMP),” refere-se a uma molécula que produz ou causa uma quantidade maior de cAMP em uma célula, ou uma quantidade maior de atividade de cAMP em uma célula, ou qualquer outro componente relevante de uma via de transdução de sinal relacionada a cAMP, ou uma resposta ou efeito fisiológico a jusante mensurável ou de uma via de sinalização cAMP, comparado a nenhum agente ou uma molécula/composição de controle. Em uma modalidade particular, o agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub> é um análogo de cAMP ou melhorador.

15 Os melhoradores cAMP da presente invenção tipicamente aumentam ou mantêm os níveis intracelulares e/ou atividade de cAMP. Mais geralmente, adenosina monofosfato cíclico (cAMP, AMP cíclico ou 3'-5'-adenosina monofosfato cíclico) atua como um importante mensageiro secundário em muitos processos biológicos. Sistemas de mensageiros secundários referem-se aos métodos de sinalização celular, por meio do qual uma molécula de sinalização difusível é rapidamente produzida/secretada em determinado sinal de ativação, que pode então ativar proteínas efetoras dentro da célula para exercer uma resposta celular.

20 Por exemplo, entre outras respostas, sinalização de cAMP transfere os efeitos de prostaglandinas, que de outra forma não podem passar através da membrana da célula. cAMP ainda regula a passagem de Ca<sup>2+</sup> através de canais iônicos.

25 Efeitos mensuráveis a jusante podem incluir maior viabilidade de célula tronco, proliferação ou expansão e auto-renovação e enxerto, entre outros, aparece a partir do entendimento na técnica e a descrição aqui. Melhoradores cAMP podem incluir “agonistas,” que tipicamente se ligam a um receptor ou outra molécula de uma célula e dispara uma resposta pela célula, e “antagonistas,” que tipicamente atuam contra e bloqueiam/inibem ação, como bloqueando a degradação de cAMP (*por exemplo*, bloqueio de uma fosfodiesterase). São ainda contemplados análogos de cAMP.

30 Atividade de cAMP pode ainda ser negativamente regulada por uma variedade de mecanismos. Por exemplo, a subunidade G<sub>α</sub>-s lentamente catalisa a hidrolise de GTP a GDP, que, por sua vez desativa a proteína G<sub>s</sub>, assim desligando a via cAMP. A via cAMP pode ainda ser desativada a jusante por diretamente inibindo adenilil ciclase ou por desfosforilação de proteínas fosforiladas por PKA. Adenilil ciclase, e assim a produção de cAMP, 35 pode ser inibida por agonistas de receptores acoplados a proteína G adenilil ciclase inibitória (G<sub>i</sub>). Decomposição de cAMP em AMP é catalisado pela enzima fosfodiesterase, que pode ainda atuar como um regulador negativo de sinalização de cAMP.

Exemplos ilustrativos de moléculas que inibem a via cAMP incluem, por exemplo cAMP fosfodiesterase, que desfosforila cAMP em AMP, reduzindo os níveis de cAMP; proteína G<sub>i</sub>, que inibe adenilil ciclase, assim, reduzindo níveis de cAMP; e toxina pertussis, que reduz os níveis cAMP.

5 Os melhoradores cAMP da invenção são tipicamente capazes de ativar a via cAMP em qualquer um dos estágios naquela via, ou podem prevenir a regulação negativa (*por exemplo*, degradação) de cAMP, e incluem produtos químicos, polipeptídeos, anticorpos, e outras moléculas contendo tais efeitos funcionais. Moléculas exemplares ou agentes que ativam a via de cAMP podem incluir, por exemplo, toxina colérica, que aumenta os níveis de  
10 cAMP; forskolina, um produto natural diterpina que ativa adenilil ciclase; e cafeína e teofilina, que inibem cAMP fosfodiesterase, levando a uma ativação de proteínas G que então ativam a via cAMP.

Exemplos ilustrativos de melhoradores cAMP incluem, entre outros forbol éster, forskolina, esclarelina, 8-bromo-cAMP, toxina da colera (CTx), aminofilina, 2,4 dinitrofenol (DNP), norepinefrina, epinefrina, isoproterenol, isobutilmetilxantina (IBMX), cafeína, teofilina (dimetilxantina), dopamina, rolipram, iloprost, prostaglandina E<sub>1</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub>, polipeptídeo de ativação de adenilato ciclase pituitária (PACAP), e polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), entre outros conhecidos na técnica. Como exemplificado acima, exemplos de melhoradores cAMP ainda incluem cAMP e análogos de cAMP, como sp-5, 6-DCI-BIMPS (BIMPS) 20 e dibutiril cAMP (dbcAMP), entre outros.

cAMP é implicado no crescimento e/ou sobrevivência de células tronco hematopoieticas em cultura (*ver, por exemplo*, Negrotto *et al.*, *Experimental Hematology* 34:1420-1428, 2006, aqui incorporado por referência em sua totalidade). Por exemplo, foi observado que 25 dois diferentes análogos cAMP, como dibutiril-cAMP e BIMPS, promovem sobrevivência de Células CD34<sup>+</sup> derivadas de cordão umbilical humano suprimindo apoptose induzida por óxido nítrico (NO) ou privação de soro. O envolvimento de via de PKA e PI3K foi demonstrado pela capacidade de seus inibidores específicos Rp-cAMP e Wortmannin ou LY294002, respectivamente, para reverter o efeito antiapoptótico de BIMPS. Enquanto trombopoietina (TPO), fator estimulante de colônia de grau nolócito (G-CSF), ou fator de célula tronco (SCF) 30 não aumenta os níveis de cAMP, a atividade antiapoptótica exercida por estes fatores de crescimento foi bloqueada por inibição de adenilato ciclase e sinergizada por BIMPS. Assim, análogos de AMP cíclico suprimem a formação de colônia reduzida em células expostas a NO ou privação de soro, mostrando que cAMP parece ser não somente uma via chave de controle de sobrevida de CD34<sup>+</sup>, mas ainda um mediador de ciclopoteção mediada por 35 TPO, G-CSF, e SCF.

Da mesma forma, a ativação de cAMP, como por injeção de isoproterenol (que estimula adenilil ciclase) ou dibutiril cíclico adenosina 3', 5'-monofosfato rapidamente após en-

xerto de célula de medula, quase imediatamente dispara as células tronco transplantadas que entram em fase S induzindo síntese de DNA (ver, por exemplo, Necas *et al.*, *Cell Proliferation*, 9:223-230, 2008, aqui incorporada por referência em sua totalidade).

Um “ativador G $\alpha$ -s ou agente de ativação” ou “agente ativador ou que ativa proteína G-alfa-s” inclui qualquer molécula capaz de ativar a subunidade alfa da proteína G estimuladora (“G $\alpha$ -s”) ou variantes de G $\alpha$ -s. Exemplos ilustrativos de ativadores de G $\alpha$ -s incluem PGE<sub>2</sub> e agonistas e derivados dos mesmos, e toxina colérica. Em uma modalidade particular, o agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub> é um ativador G $\alpha$ -s.

Portanto, composições da invenção que compreendem PGE<sub>2</sub> e agentes que têm atividade dmPGE<sub>2</sub>, por exemplo, análogos dmPGE, análogos cAMP ou melhorados, e/ou ativadores G $\alpha$ -s podem ser utilizados para preservar ou manter viabilidade celular, e aumento de enxerto, retorno, auto-renovação e/ou expansão de células tronco hematopoieticas *in vivo*.

Assim, em modalidades particulares, enxerto/enxerto potencial/ e/ou expansão *in vivo* de células tronco hematopoieticas/progenitoras é aumentada pelo contato das células *ex vivo* ou *in vitro* com PGE<sub>2</sub> e análogos dos mesmos (por exemplo, dmPGE<sub>2</sub>), e agentes que têm atividade dmPGE<sub>2</sub> em qualquer combinação particular, entre outros.

Em modalidades particulares, a população de células é tratada (por exemplo, contada) com um ou mais agentes, cada um em uma concentração final de cerca de 1  $\mu$ M a cerca de 100  $\mu$ M. Em certas modalidades, a população de células é tratada com um ou mais agentes farmacêuticos, cada um em uma concentração final de cerca de  $1 \times 10^{-14}$  M a cerca de  $1 \times 10^{-3}$  M, cerca de  $1 \times 10^{-13}$  M a cerca de  $1 \times 10^{-4}$  M, cerca de  $1 \times 10^{-12}$  M a cerca de  $1 \times 10^{-5}$  M, cerca de  $1 \times 10^{-11}$  M a cerca de  $1 \times 10^{-4}$  M, cerca de  $1 \times 10^{-10}$  M a cerca de  $1 \times 10^{-5}$  M, cerca de  $1 \times 10^{-9}$  M a cerca de  $1 \times 10^{-4}$  M, cerca de  $1 \times 10^{-8}$  M a cerca de  $1 \times 10^{-4}$  M, cerca de  $1 \times 10^{-7}$  M a cerca de  $1 \times 10^{-4}$  M, cerca de  $1 \times 10^{-6}$  M a cerca de  $1 \times 10^{-4}$  M, ou qualquer faixa interveniente de concentrações finais.

Em outra modalidade particular, a população de células é tratada com um ou mais agentes, cada um em uma concentração final de cerca de  $1 \times 10^{-14}$  M, cerca de  $1 \times 10^{-13}$  M, cerca de  $1 \times 10^{-12}$  M, cerca de  $1 \times 10^{-10}$  M, cerca de  $1 \times 10^{-9}$  M, cerca de  $1 \times 10^{-8}$  M, cerca de  $1 \times 10^{-7}$  M a cerca de  $1 \times 10^{-6}$  M, cerca de  $1 \times 10^{-5}$  M, cerca de  $1 \times 10^{-4}$  M, cerca de  $1 \times 10^{-3}$  M, ou qualquer concentração final interveniente. Em tratamentos compreendendo um ou mais agentes, os agonistas podem estar em concentrações diferentes de cada outro ou na mesma concentração.

Em modalidades particulares, a população de células é tratada (por exemplo, contada com um ou mais agentes) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 ou mais vezes. A população de células pode ser contada de modo intermitente, episódica, ou sequencial contada com

um ou mais agentes dentro do mesmo vaso (*por exemplo*, contatar a população de células com uma droga por um período de time, trocando o meio de cultura e/ou lavar a população de células, então repetindo o ciclo com a mesma ou uma combinação diferente de agentes farmacêuticos para o mesmo período de tempo predeterminado ou um período de tempo 5 diferente predeterminado).

Em modalidades preferenciais, a população de células é tratada com um agonista PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub> ou PGE<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, *por exemplo*, 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>, em uma concentração final de cerca de 10 µM por 2 horas em cerca de 37°C.

Durações exemplares de tratamento geralmente incluem um tempo de tratamento 10 de cerca de 1 hora, cerca de 2, horas, ou cerca de 3 horas.

Em modalidades particulares, agentes úteis na invenção podem ser transferidos a partir de um primeiro vaso a um segundo vaso, em que o segundo vaso é um frasco de 2 ml com uma tampa de teflon que é isenta de endotoxina e é apropriada para armazenamento ou administração *ex vivo* do agente, em que o agente é 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> em uma concentração estoque de cerca de 10mM, fornecida em dimetil sulfóxido (DMSO) que é substancialmente isenta de metil acetato, e em que há uma camada de ar no frasco. Preferencialmente, a composição inteira, incluindo o vaso e o solvente, é estéril e isento em endotoxina.

Em certas modalidades, o segundo ou outro vaso pode compreender células incluindo células tronco hematopoiéticas ou progenitoras, como células de medula óssea, sangue periférico células, ou células de cordão umbilical. Assim, estas e outras modalidades 20 podem envolver transferir a composição a partir do primeiro ou vaso inicial a um segundo vaso que é apropriado para condições de tratamento *ex vivo* e que compreende células tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um meio apropriado. Alternativamente, a população de células humanas pode ser transferida ao primeiro ou segundo vaso que já contém 25 a composição, como uma bolsa ou tubo de PE, e que já é apropriado para tratamento ou condições de incubação *ex vivo*.

E. Composições da invenção prontas para administração

As composições terapêuticas da invenção são estéreis, e são apropriadas e prontas para administração (*ou seja*, podem ser administradas sem outro qualquer processamento) 30 para pacientes humanos. Em algumas modalidades, a composição terapêutica está pronta para infusão em um paciente. Como usado aqui, os termos “pronto para administração,” “preparado para administração” ou “pronto para infusão” refere-se a uma composição a base de célula da invenção que não requer qualquer outro tratamento ou manipulações antes de transplante ou administração a um sujeito.

35 As composições terapeuticamente aceitáveis estéreis apropriadas para administração a um paciente podem compreender um ou mais carreadores farmaceuticamente aceitáveis (aditivos) e/ou diluentes (*por exemplo*, meios farmaceuticamente aceitáveis, por exem-

5 plo, meio de cultura de células), ou outros componentes farmaceuticamente aceitáveis. Car-  
readores e/ou diluentes farmaceuticamente aceitáveis são administrados em parte pela  
composição particular sendo administrada, bem como pelo método particular usado para  
administrar a composição terapêutica. Assim, há uma variedade de formulações apropriadas  
5 de composições terapêuticos da presente invenção (ver, por exemplo, Remington's Pharma-  
ceutical Sciences, 17<sup>th</sup> ed. 1985)).

10 Em modalidades particulares, as composições de célula terapêutica compreendendo  
células tronco hematopoieticas e/ou progenitoras compreendem um meio de cultura de  
célula farmaceuticamente aceitável. Composição terapêutica compreendendo uma composi-  
ção a base de célula da presente invenção pode ser administrada separadamente por méto-  
dos de administração enteral ou parenteral ou em combinação com outros compostos apro-  
priados para efetuar os objetivos de tratamento desejados.

15 O carreador e/ou diluente farmaceuticamente apropriado deve ser suficientemente  
de alta pureza e de suficientemente baixa toxicidade para gerar este apropriado para admi-  
nistração ao sujeito humano sendo tratado. Deve ainda manter ou aumentar a estabilidade  
da composição terapêutica. O carreador farmaceuticamente aceitável pode ser líquido ou  
sólido e é selecionado, com o modo planejado de administração em mente, para fornecer o  
bulk desejado, consistência, etc., quando combinado com outros componentes da composi-  
ção terapêutica da invenção. Por exemplo, o carreador farmaceuticamente aceitável pode  
20 ser, entre outros, um agente de ligação (por exemplo, amido de milho pré-gelatinizado, poli-  
vinilpirrolidona ou hidroxipropil metilcelulose, etc.), um diluente (por exemplo, lactose e ou-  
tros açúcares, celulose microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de cálcio, etil celulose, poli-  
acrilatos, fosfato de hidrogênio cálcio, etc.), um lubrificante (por exemplo, estearato de mag-  
nésio, talco, sílica, dióxido de silício coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, óleos  
25 vegetais hidrogenados, amido de milho, polietileno glicos, benzoato de sódio, acetato de  
sódio, etc.), um desintegrante (por exemplo, amido, amido glicolato de sódio, etc.), ou um  
agente molhante (por exemplo, lauril sulfato de sódio, etc.). Outros carreadores farmaceuti-  
camente apropriados para as composições da presente invenção incluem, entre outros,  
30 água, soluções de sal, alcoóis, polietileno glicos, gelatinas, amilosos, estearatos de magné-  
sio, talcos, ácidos silícicos, parafinas viscosas, hidroximetilceluloses, polivinilpirrolidonas e  
semelhantes.

35 Tais soluções carreadoras ainda podem conter tampões, diluentes e outros aditivos  
apropriados. O termo "tampão" como usado aqui refere-se a uma solução ou líquido cuja  
preparação química neutraliza ácidos ou bases sem uma alteração significativa em pH.  
Exemplos de tampões imaginados pela invenção incluem, entre outros, salina tamponada de  
fosfato Dulbecco (PBS), solução de Ringer, 5% dextrose em água (D5W), salina nor-  
mal/fisiológico (0,9% NaCl).

Estes carreadores farmaceuticamente aceitáveis e/ou diluentes podem estar presentes em quantidades suficientes para manter um pH da composição terapêutica de entre cerca de 3 e cerca de 10. Como tal, o agente de tamponamento pode ser tanto quanto cerca de 5% em um peso a base de peso da composição total. Eletrólitos como, entre outros, cloreto de sódio e cloreto de potássio podem ainda ser incluídos na composição terapêutica.

Em um aspecto, o pH da composição terapêutica está na faixa de cerca de 4 a cerca de 10. Alternativamente, o pH da composição terapêutica está na faixa de cerca de 5 a cerca de 9, de cerca de 6 a cerca de 9, ou de cerca de 6,5 a cerca de 8. Em outra modalidade, a composição terapêutica compreende um tampão contendo um pH em uma de ditas 10 faixas de pH. Em outra modalidade, a composição terapêutica tem um pH de cerca de 7. Alternativamente, a composição terapêutica tem um pH em uma faixa de cerca de 6,8 a cerca de 7,4. Ainda em outra modalidade, a composição terapêutica tem um pH de cerca de 7,4.

A composição estéril da invenção pode ser uma solução estéril ou suspensão em 15 um meio farmaceuticamente aceitável não tóxico. O termo "suspensão" como usado aqui pode se referir a condições não aderentes em que as células não são ligadas a um suporte sólido. Por exemplo, as células mantidas em suspensão podem ser agitadas e não são aderidas a um suporte, como uma placa de cultura.

Uma suspensão é uma dispersão (mistura) em que uma espécie finamente dividida 20 é combinada com outras espécies, com a última sendo assim finamente dividida e mistura que não rapidamente assenta. Uma suspensão pode estar preparada usando um veículo como um meio líquido, incluindo uma solução. Em modalidades particulares, a composição terapêutica da invenção é uma suspensão, onde as células tronco hematopoieticas e/ou progenitoras são dispersas dentro de um meio líquido aceitável ou solução, *por exemplo*, 25 salina ou meio isento de soro, e não estão ligadas a um suporte sólido. Na vida diária, as suspensões mais comuns são aquelas de sólidos em água líquida. Entre os diluentes aceitáveis, *por exemplo*, veículos e solventes, que podem ser empregados são água, solução de Ringer, solução de cloreto de sódio isotônico (salina), e meio de cultura de célula isento de soro. Em algumas modalidades, soluções hipertônicas são empregadas no preparo de suspensões. Além disso, óleos estéreis fixados são convencionalmente empregados como um 30 solvente ou meio de suspensão. Para aplicação parenteral, veículos particularmente apropriados consistem de soluções, preferencialmente soluções oleosas ou aquosas, bem como suspensões, emulsões ou implantes. Suspensões aquosas podem conter substâncias que reduzem a viscosidade da suspensão que aumentam a viscosidade da suspensão e incluem, *por exemplo*, carboximetil celulose de sódio, sorbitol e/ou dextrano. Em algumas modalidades, a solução de infusão é isotônica aos tecidos do sujeito. Em algumas modalidades, a 35 solução de infusão é hipertônica aos tecidos do sujeito.

O carreador, diluentes e outros componentes farmaceuticamente aceitáveis compreendendo a composição terapêutica pronta para administração da invenção são derivados de reagentes em grau farmacêutico U.S. que irão permitir uma composição terapêutica a ser usada em regimes clínicos. Tipicamente, estes reagentes acabados, incluindo qualquer meio, solução, ou outros carreadores e/ou diluentes farmaceuticamente apropriados são esterilizados de modo convencional na técnica, como filtro esterilizado, e são testados para vários contaminantes indesejados, como micoplasma, endotoxina, ou contaminação por vírus, antes de uso. O carreador farmaceuticamente aceitável em uma modalidade é substancialmente isenta de proteínas naturais de origem humana ou animal, e apropriado para armazenar a população de células da composição terapêutica, incluindo células tronco hematopoiéticas e progenitoras. A composição terapêutica é pretendida para ser administrada em um paciente humano, e assim, é substancialmente isenta de componentes de cultura celular como albumina sérica bovina, soro de cavalo, e soro bovino fetal.

A invenção ainda contempla, em parte, o uso de um meio de cultura celular farmaceuticamente aceitável em composições particulares e/ou culturas da presente invenção. Tais composições são apropriadas para administração aos sujeitos humanos. Genericamente falando, qualquer meio que suporta a manutenção, crescimento, e/ou saúde das células desejadas reprogramadas e/ou programadas da invenção são apropriadas para uso como um meio de cultura de célula farmacêutica. Em modalidades particulares, o meio de cultura celular farmaceuticamente aceitável é um meio isento de soro.

A composição terapêutica pode compreender meio isento de soro para armazenar a população de células compreendendo a composição. Meio isento de soro tem várias vantagens ao longo do meio contendo soro, incluindo uma composição melhor definida e simplificada, um grau reduzido de contaminantes, eliminação de uma fonte potencial de agentes infecciosos, e custo inferior. Em várias modalidades, o meio isento de soro é isento de animal, e pode opcionalmente ser isento de proteína. Opcionalmente, o meio pode conter proteínas recombinantes biofarmaceuticamente aceitáveis. Meio "isento de animal" refere-se ao meio em que os componentes são derivados de fontes não animais. Proteínas recombinantes substituem proteínas animais em meio isento de animal e os nutrientes são obtidos de fontes de planta sintéticas ou microbianas. Meio isento de proteína, em contraste, é definido como substancialmente isento de proteína.

O meio isento de soro empregado na presente invenção é uma formulação apropriada para uso em protocolos e produtos terapêuticos humanos. Um meio isento de soro é QBSF-60 (Quality Biological, Inc.), como descrito na patente U.S. No. 5.945.337. QBSF-60 é isoptimizado com componentes em grau farmacêutico U.S. e é composto do meio basal IMDM mais 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, albumina sérica humana de grau injetável (4 mg/ml) (Alfa Therapeutic Corporation), parcialmente transfer-

rina humana saturada em ferro (300 µg/ml) (Sigma Chemical Corporation ou Bayer Corporation) e insulina sódica recombinante humana (0,48 U/ml) (Sigma). Outros meios isentos de soro conhecidos na técnica incluem, entre outros: Life Technologies Catalogue StemPro-34 serum free culture media; Capmany, et al., Short-term, serum-free, static culture of Cord blood-derived CD34<sup>+</sup>cells: effects of FLT3-L e MIP-1 $\alpha$  on in vitro expansion of hematopoietic progenitor células, *Haematologica* 84:675-682 (1999); Daley, J P, et al., Ex vivo expansion of human hematopoietic progenitor cells in serum-free StemProTM-34 Medium, *Focus* 18(3):62-67; informações de catálogo da Life Technologies em meio de cultura isento de soro AIM V; informações de catálogo BioWhittaker em meio de cultura isento de soro X-VIVO 10; 5.397.706 intitulado "Serum-free basal e culture medium for hematopoietic e leukemia cells"; sem proliferação celular; Kurtzberg et al., 18:153-4 (2000); Kurtzberg et al., *Exp Hematol* 26(4):288-98 (April 1998).

Um especialista na técnica poderia apreciar que o exemplo acima de meio é ilustrativo e de nenhum modo limita a formulação do meio apropriado para uso na presente invenção e que há muitos ditos meios conhecidos e disponíveis àqueles na técnica.

Em várias modalidades, a composição terapêutica da invenção compreende uma solução estéril de albumina sérica humana (HSA), como 5% HSA, e dextrano de peso molecular baixo (LMW).

A composição terapêutica é substancialmente isenta de micoplasma, endotoxina, e contaminação microbiana. Em modalidades particulares, a composição terapêutica contém menos do que cerca de 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0,1, 0,05 µg/ml albumina sérica bovina.

Por "substancialmente livre" com relação à endotoxin entende-se que há menos endotoxina por dose de células do que é permitido pelo FDA para um produto biológico, que é uma endotoxina total de 5 EU/kg de peso corporal por dia, que para uma pessoa de peso médio 70 kg é 350 EU por dose total de células.

Com relação ao micoplasma e contaminação microbiana, "substancialmente livre" como usado aqui significa uma leitura negativa para os testes geralmente aceitos conhecidos aos especialistas na técnica. Por exemplo, contaminação por micoplasma é determinada por subcultivo de uma amostra da a composição terapêutica em meio caldo e distribuída em placas ágar no dia 1, 3, 7, e 14 a 37°C com controles positivos e negativos apropriados. A aparência da amostra é comparada microscopicamente, a 100 $\times$ , àquela do controle positivo e negativo. Além disso, a inoculação de uma cultura de célula indicadora por 3 e 5 dias é avaliado em 600 $\times$  para a presença de micoplasmas por microscopia de epifluorescência usando um fluorocromo de ligação a DNA. A amostra é considerada satisfatória se o procedimento em meio de ágar e/ou o caldo e o procedimento de cultura de célula indicadora não mostra evidência de contaminação por micoplasma.

As composições terapêuticas da invenção são HLA tipificadas e podem ser compa-

tíveis ou parcialmente compatíveis a um paciente específico para transplante. Tipo HLA refere-se a um único conjunto de proteínas chamadas抗ígenos de leucócitos humanos. Estas proteínas estão presentes em cada célula de indivíduo e permitem que o sistema imune reconheça 'auto' de 'estranho'. A administração de células ou tecidos são reconhecidos como estranhos podem levar a problemas de compatibilidade como imuno-rejeição ou doença do enxerto-hospedeiro (GVHD). Assim, tipo HLA e combinação é particularmente importante em transplante de órgão e tecido.

Há seis principais HLAs (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP, e HLA-DQ). Cada抗ígeno HLA tem várias isoformas na população humana, e cada indivíduo pode ter 10 dois isômeros diferentes para cada HLA devido a natureza diploide de nosso genoma. Portanto, uma combinação completa poderia combinar doze de doze isoformas. Uma célula ou tecido doado a partir dos mesmos indivíduos como, ou um gêmeo idêntico de, o receptor pretendido poderia ter um tipo HLA perfeito e é referenciado como singeneico ou autólogo. É ainda entendido que certos fatores incluindo, entre outros, de fundo étnico e raça correlaciona-se com certos tipos de HLA.

Muitas isoformas HLA principais e secundárias existem e é entendido que uma combinação apropriada inclui uma combinação entre um subconjunto dos principais HLAs, todos os principais HLAs, alguns ou todos os principais e secundários HLAs ou qualquer combinação conhecida na técnica que mitiga imuno-rejeição ou GVDH. É ainda entendido 20 que diretrizes específicas para os quais constitui uma boa combinação de tipo de HLA depende de muitos fatores. Portanto, o julgamento deve ser feito por um especialista na técnica para avaliar a adequabilidade de certa célula ou amostra de tecido para transplante em certo indivíduo.

Tipo HLA pode ser determinado usando os chamados métodos de resolução, por 25 exemplo por sero-tipagem, ou usando métodos a base de anticorpo. Sero-tipagem é baseado no reconhecimento de anticorpo de tipos HLA. Sero-tipagem podem distinguir entre 28 diferentes genes HLA-A, 59 genes HLA-B e 21 genes HLA-C. Uma combinação perfeita de métodos de sero-tipagem poderiam ser um dos chamados seis de seis combinações referindo-se aos dois alelos para cada HLA (A, B, e C) presente em cada indivíduo. Em certos casos, uma combinação cinco de seis ou menos pode ser considerada uma boa compatibilidade como determinado por um especialista na técnica.

Outros métodos de média ou baixa resolução para determinar tipo de HLA avalia as 35 isoformas HLA do indivíduo, mas não dependem da determinação da sequência real de um alelo HLA de indivíduo. Geralmente, o doador é relacionado ao indivíduo que recebe a amostra, neste caso sero-tipagem isolada ou em combinação com outros métodos de resolução médios ou baixos podem ser suficientes para determinar se uma amostra é apropriada para transplante. Em outros casos uma compatibilidade de cinco de seis ou inferior é pron-

tamente encontrada, mas uma compatibilidade perfeita não é. Em tais casos pode ser vantoso usar células ou tecidos com uma compatibilidade menor em vez de gastar tempo e esforço em encontrar uma melhor compatibilidade de tipo HLA.

5 Métodos de alta resolução envolve avaliar a sequência específico dos genes HLA ou produtos de expressão de gene (proteína ou RNA). Métodos de alta resolução podem distinguir entre centenas de diferentes isoformas.

Em um mínimo, tipagem de HLA da composição terapêutica é realizada por seis locais HLA, HLA-A, -B, e -DR, por exemplo, em nível de antígeno de alta resolução/split.

10 Métodos de teste a base de DNA podem ser utilizados para tipagem HLA-DR. Testes a base de DNA podem ser usados para HLA-A e -B. Diretrizes para centro de transplante para tipagem de paciente, família e para confirmar os tipos HLA de doadores potenciais não relacionados incluem, tipagem de locais HLA-A, B, e -DR usando principalmente métodos de teste a base de DNA em resolução em nível de alelo para DRB1 e nível de antígeno de baixa resolução/split para HLA-A e -B. A tipagem de um paciente e o doador selecionado pode ser 15 realizado usando o mesmo conjunto de reagentes, metodologia, e critérios de interpretação com amostras de tecido frescas para garantir identidade HLA. Garantia de qualidade e controle de qualidade para testagem HLA são cumpridos com.

20 Em várias modalidades, a população de células compreende células tronco hematopoiéticas ou progenitoras haplotipadas. Em algumas modalidades, a população de células compreendendo a composição terapêutica é HLA tipada baseado em HLA-A, HLA-B, HLA-C, e HLA-DRB1. Em modalidades particulares, a população de células é HLA tipada baseada no grupo que consiste de HLA-DRB3/4/5, HLA-DQB1, e DPB1. Em algumas modalidades, a população de células compreendendo a composição terapêutica é compatível com um paciente humano específico. Em algumas modalidades, a população de células HLA 25 haplotipadas tem 4 de 6 HLA compatíveis com um sujeito humano específico. Compatibilidade de HLA pode ser baseada em alelos ou抗ígenos e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, a população de células HLA haplotipadas é uma não compatibilidade parcial com um sujeito humano específico, como o sujeito ao qual a composição terapêutica é administrada.

30 A composição terapêutica da invenção é capaz de obter licença de produto a partir do FDA (*ou seja*, aprovação de FDA) e outras autoridades saudáveis em outros países e territórios regulatórios, bem como rotulagem de produto com informações caracterizantes em relação a indicação do produto, eficácia do produto, segurança e pureza. A licença do FDA é possivelmente baseada em dose celular e não compatibilidade de HLA. A composição terapêutica da invenção, em algumas modalidades, é processada e criopreservada de acordo com padrões acreditados, estéreis, e rotulados por, por exemplo, tipagem RH e ABO, tipagem HLA e A, B, e DR-beta-1 loci, e contagens pós processamento, contagens de 35

CD34<sup>+</sup>, contagens de CFU-GM, triagem de doença infecciosa, histórico familiar e evidência de consentimento maternal para doação. A composição terapêutica a ser usada para transplante poderiam incluir células que são compatíveis em um mínimo de 4/6 de抗ígenos ou 3/6 alelos, e uma dose celular, como descrito aqui.

5           F.     Bio-vasos inteligentes

Em várias modalidades, a invenção contempla, em parte, métodos de terapia celular, por exemplo, transplante de células tronco hematopoiéticas/progenitoras, que compreendem contatar uma população de células com um ou mais agentes farmacêuticos em um vaso isento de endotoxinas como aqui descrito, em condições suficientes para aumentar o 10 enxerto e/ou a expansão *in vivo* das células contatadas em um sujeito e administrar as células contatadas ao sujeito.

A invenção contempla ainda, em parte, métodos para aumentar enxerto de células tronco em um sujeito (por exemplo, um ser humano) que compreendem contatar uma população de células que compreende células tronco hematopoiéticas e/ou progenitoras (por 15 exemplo, células de medula óssea, células de sangue periférico, e/ou células de sangue de cordão umbilical) com agentes que aumentam a expressão de CXCR4 em células tronco hematopoiéticas e/ou progenitoras, como PGE<sub>2</sub>, dmPGE<sub>2</sub>, ou agentes que têm atividade de dmPGE<sub>2</sub>, em um vaso isento de endotoxinas como aqui descritos, em condições suficientes para aumentar o enxerto das células contatadas em um sujeito e administrar as células contatadas ao sujeito.

A invenção contempla ainda, em parte, métodos para aumentar o número de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um sujeito (por exemplo, um ser humano) que compreendem contatar uma população de células que compreende células tronco e/ou progenitoras hematopoiéticas (por exemplo, células de medula óssea, células de sangue periférico, e/ou células de sangue de cordão umbilical) com agentes que aumentam a expressão do CXCR4 em células tronco hematopoiéticas e/ou progenitoras, como PGE2 ou um análogo do mesmo, por exemplo, 16,16-dimetil PGE2 (dmPGE2) ou um agente contendo atividade dmPGE<sub>2</sub> em um vaso isento de endotoxinas como descrito aqui, em condições suficientes para aumentar a vivo expansão das células contatadas em um sujeito e administrar as células contatadas ao sujeito.

Em várias modalidades ilustrativas, a invenção fornece, em parte, um método de contatar células tronco hematopoiéticas ou progenitoras com PGE<sub>2</sub> ou um análogo do mesmo, por exemplo, 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> (dmPGE<sub>2</sub>) ou um agente contendo atividade de dmPGE<sub>2</sub> em um vaso isento de endotoxinas como aqui descrito em condições suficientes para manter a viabilidade das células tronco/progenitoras e aumentar o enxerto, retorno e expansão *in vivo*.

Em uma modalidade, a invenção fornece, em parte, um método para preparar uma

população de células, por exemplo, células de medula óssea, células mobilizadas de sangue periférico, células de sangue de cordão umbilical, para um transplante, por exemplo, transplante de medula óssea, que compreende contatar as células com dmPGE<sub>2</sub> ou um agente contendo atividade de dmPGE<sub>2</sub> em um vaso isento de endotoxinas como aqui descrito, em 5 condições suficientes para aumentar o enxerto e/ou expansão *in vivo* das células contatadas em um sujeito, comparado a células não contatadas.

Em uma modalidade particular, a invenção fornece um método para aumentar o enxerto de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um sujeito compreende administrar ao sujeito, uma fonte ou população de células contatada com dmPGE<sub>2</sub> ou um agente 10 contendo atividade de dmPGE<sub>2</sub> em um vaso isento de endotoxinas como aqui descrito, em condições suficientes para aumentar o enxerto das células contatadas em um sujeito, comparado a células não contatadas.

Em outra modalidade particular, a invenção contempla um método de tratamento de um sujeito em necessidade de um transplante de células tronco hematopoiéticas/progenitoras que compreende: selecionar o sujeito em necessidade de um transplante 15 de células tronco hematopoiéticas/progenitoras e administrar a um sujeito, uma população de células contatada com dmPGE<sub>2</sub> ou um agente contendo atividade de dmPGE<sub>2</sub> em um vaso isento de endotoxinas, como aqui descrito, em condições suficientes para aumentar o enxerto, e/ou expansão *in vivo* das células contatadas em um sujeito em comparação com 20 células não contatadas.

Como usado aqui, o termo "vaso" refere-se geralmente a qualquer item capaz de ser utilizado com objetivo de cultivar, manusear, manipular, armazenar, analisar, incubar, administrar e de outro modo estabelecer, apoiar, colher as populações de células compreendendo células tronco hematopoiéticas ou progenitoras e subprodutos ex vivo ou *in vitro* do mesmo ou de outro modo para uma variedade de propósitos como estabelecido e aqui contemplado.

Modalidades ilustrativas de vasos incluem, entre outras: bolsas (por exemplo, bolsas intravenosas (IV), bolsas de cultura de células, por Exemplo, VueLife™, KryoSure™, KryoVue™, Lifecell®, PermaLife™, X-Fold™, Si-Culture™, VectraCell™), biorreatores, células ou dispositivos de cultura de tecidos, bolsas, cápsulas, frascos de cultura, aparelhos, fábricas de células, recipientes, tubos de cultura (por exemplo, tubos de microcentrifuga, tubos EPPENDORF®, FALCON® tubos cônicos, etc.), placas de cultura (por exemplo, placas de Petri), frascos de cultura, frascos, garrafas giratórias, placas multi poços (por exemplo, 2 poços, 4 poços, 6 poços, 12 poços, 24 poços, 48 poços, 96 poços, e 384 poços), micro incubadoras, micro carreadores, microplacas, micro lâminas, e lâminas de câmaras, dispositivos de implante (por exemplo esponjas de colágeno). O vaso pode ser utilizado múltiplas vezes ou pode ser um vaso de uso único.

Preferencialmente, os vasos da presente invenção são livres de endotoxinas, e fabricados de acordo com as práticas BPF como discutido em outras partes aqui.

Em modalidades particulares, os vasos podem ser fabricados a partir de materiais que compreendem uma ou mais das seguintes características: permeabilidade a gás (materiais têm taxas apropriadas de transferência de gases para oxigênio, dióxido de carbono e nitrogênio), taxas insignificantes de perda de água (materiais são praticamente impermeáveis à água); quimicamente e biologicamente inertes (materiais não reagem com os conteúdos do vaso), e retenção de flexibilidade e força em várias condições (materiais permitem ao vaso ser tratado em micro-ondas, tratado com radiação UV, centrifugados, ou usados dentro de uma vasta faixa de temperaturas, por exemplo, de -100 ° C a +100 ° C).

Os especialistas na técnica relevante podem selecionar materiais poliméricos apropriados com a permeabilidade desejada, propriedades biorreativas e biocompatíveis, resistência à temperatura, flexibilidade, condutividade térmica, e resistência.

Materiais ilustrativos que são apropriados para a fabricação de vasos da presente invenção incluem, entre outros: vidro, cerâmica, metais, monômeros e polímeros elastômeros termofixos e termoplásticos e monômeros e polímeros termoplásticos. Exemplos de materiais termoplásticos apropriados para fabricação de vasos da presente invenção incluem, entre outros: resinas de acetal, delrina, fluorocarbonetos, poliésteres, elastômeros de poliéster, metalocenos, poliamidas, náilon, cloreto de polivinila, polibutadienos, resinas de silicone, ABS (uma sigla de "acrilonitrila, butadieno, estireno"), policarbonato (também conhecido na indústria de plásticos como "PC"), polipropileno, polietileno, poliestireno, polímeros de cristal líquido, ligas de e combinações de misturas e compostos dos mesmos, e reforçado com ligas e combinações e misturas e compostos das mesmas.

Em modalidades particulares, os vasos podem ser fabricados de um ou mais materiais selecionados do grupo que consiste de: dietilexil ftalato, cloreto de polivinila, polietileno, polipropileno, e etileno propileno fluorado.

Em várias modalidades ilustrativas, um vaso pode ser fabricado para ter uma espessura de parede transversal que é baseada em e é uma função implícita dos materiais selecionados e as aplicações pretendidas. Exemplos de espessuras de parede transversal incluem, entre outros, espessuras entre cerca de 0,25 milímetros e cerca de 2,0 mm, entre cerca de, 5 mm e cerca de 1,5 mm e, entre cerca de 0,75 mm e cerca de 1,25 mm. Em modalidades particulares, a espessura da parede transversal de um vaso é pelo menos 0,2 mm, 0,3 mm, 0,4 mm, 0,5 mm, 0,6 mm, 0,7 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1,0 mm, 1,1 mm, 1,2 mm, 1,3 mm, 1,4 mm, 1,5 mm, 1,6 mm, 1,7 mm, 1,8 mm, 1,9 mm ou 2,0 mm ou qualquer espessura interveniente.

Em modalidades ilustrativas particulares, os vasos da presente invenção são desenhados para acomodar volumes específicos. Exemplos de volumes dos vasos da presente

invenção incluem, entre outros, volumes de cerca de 10 mL, cerca de 25 mL, cerca de 50 mL, cerca de 75 mL, cerca de 100 mL, cerca de 150 mL, cerca de 250 mL, cerca de 500 mL, cerca de 750 mL, cerca de 1000 mL, cerca de 1250 mL, cerca de 1500 mL, cerca de 1750 mL, cerca de 2000 mL, ou mais, incluindo qualquer volume interveniente. Por exemplo, volumes intervenientes entre 10 mL e 25 mL, incluem 11 mL, 12 mL, 13 mL, 14 mL, 15 mL, 16 mL, 17 mL, 18 mL, 19 mL, 20 mL, 21 mL, 22 mL, 23 mL, e 24 mL.

Em certas modalidades, um vaso contemplado aqui compreende 1, 2, 3, 4 ou 5 compartimentos. Os compartimentos podem ser do mesmo tamanho ou de tamanhos diferentes e podem ter as mesmas porosidades ou diferentes. Em uma modalidade, a porosidade dos compartimentos adjacentes é tal que as moléculas pequenas, os nutrientes, os polipeptídeos, e/ou fatores de crescimento podem ser livremente trocados entre os compartimentos, mas onde as células de cada compartimento estão limitadas aos seus respectivos compartimentos.

Um especialista na técnica relevante pode fabricar um vaso contendo a espessura desejada, o volume, o número de compartimentos com base no conhecimento dos materiais de fabricação e das utilizações pretendidas do vaso.

Em modalidades particulares, os vasos podem ser fabricados a partir de materiais que acomodam revestimentos especiais, filmes, ou outros agentes, por exemplo, um PGE<sub>2</sub> ou um agente contendo atividade de dmPGE<sub>2</sub> ou combinação do mesmo.

A superfície interior do vaso pode ser projetada para acomodar o revestimento com várias moléculas hidrofóbicas, hidrofílicas ou anfipáticas usando métodos conhecidos dos especialistas na técnica relevante. Por exemplo, materiais hidrofóbicos comumente utilizados, como por exemplo, materiais termofixos, elastômeros, borrachas e termoplásticos como os poliestirenos, policarbonatos, ABS, e outros materiais poliméricos aqui revelados acomodam a ligação de moléculas hidrofóbicas (por exemplo proteínas contendo uma ou mais regiões hidrofóbicas). Além disso, as aplicações experimentais específicas, industriais ou clínicas podem exigir, excluir ou ser indiferentes para a ligação de vários tipos de moléculas como, por exemplo, ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos, ou semelhantes. Também pode ser desejável prevenir, minimizar e/ou maximizar moléculas de ligação para o substrato, dependendo dos objetivos de uma aplicação particular.

Em modalidades particulares ilustrativas, os vasos aqui previstos compreendem uma ou mais portas de entrada e/ou de saída para introduzir, trocar, ou remover compostos, células, meio de cultura de células, e semelhantes. As portas podem fornecer acesso sem agulha ou podem incluir pontos de acesso para agulhas, conforme apropriado. Cada porta pode conter um ou mais adaptadores (por exemplo, adaptadores luer), válvulas e/ou filtros.

A presente invenção contempla, em parte, vasos compreendendo um ou mais dispositivos em qualquer configuração e combinação apropriadas e que indicam, por exemplo,

a temperatura do conteúdo do vaso, o tempo que o vaso esteve em dada temperatura, e diversas condições ambientais (por exemplo, pH, concentração de oxigênio, concentração de dióxido de carbono, concentração de glicose). A invenção contempla dispositivos na forma de cartões, fitas, discos, adesivos, etiquetas, sondas, sensores, dispositivos eletrônicos 5 pequenos, e similares. Os dispositivos contemplados podem ser integrados ao material do vaso ou alternativamente, podem ser fabricados separadamente do vaso e, subsequentemente, de forma permanente ou não, permanente afixados ou aderidos à superfície exterior do vaso.

Em uma modalidade, um vaso compreende um dispositivo indicador de temperatura. 10 Em uma modalidade preferencial, um vaso compreende tanto um dispositivo indicador de temperatura quanto o um dispositivo indicador do tempo decorrido tanto separadamente, como dispositivos individuais ou combinados como um único dispositivo. Ainda em outras modalidades, o vaso compreende um dispositivo indicador de temperatura, um dispositivo indicador do tempo decorrido, e um ou mais dispositivos indicam uma condição ambiental. A 15 pluralidade de dispositivos pode ser fabricada separadamente, como dispositivos individuais ou fabricados como um único dispositivo.

Como usado aqui, o "dispositivo indicador de temperatura" refere-se a um dispositivo que detecta, mede e/ou indica a temperatura do vaso e/ou o conteúdo do vaso e que compreende uma pluralidade de "indicadores de temperatura." Como usado aqui, o "indicador de temperatura" refere-se a um indicador que produz um sinal que indica a temperatura. 20 O indicador de temperatura pode produzir um sinal que corresponde ao tempo real da temperatura ou exposição a uma temperatura em particular, para qualquer período de tempo predeterminado. Em modalidades particulares, o indicador de temperatura é reversível. Em outras modalidades, um ou mais indicadores de temperatura irreversivelmente indicam que 25 o vaso e/ou conteúdo do vaso atingiram uma temperatura predeterminada ou experimentaram uma temperatura predeterminada por um determinado período de tempo. Em modalidades adicionais, um dispositivo indicador de temperatura compreende um ou mais indicadores de temperatura reversíveis e irreversíveis em qualquer número de combinações.

O dispositivo indicador de temperatura indicando pode ser ativado pelo usuário, ou 30 ativado por exposição a uma temperatura predeterminada. Como usado aqui, o termo "temperatura predeterminada" refere-se a uma faixa de temperaturas selecionada para monitoramento pelo usuário. Em várias modalidades, a temperatura predeterminada é uma "temperatura alvo" que indica a temperatura desejada ou faixa de temperaturas para a qual o vaso é contemplado para uso. Em varias modalidades, um dispositivo indicador de temperatura 35 fornece indicadores de temperatura que indicam uma ou mais temperaturas predeterminadas, ou seja, temperaturas do vaso e/ou conteúdo do vaso na própria, acima ou de uma temperatura alvo, ou acima ou, abaixo ou dentro de uma faixa de temperaturas alvo. A pre-

sente invenção contempla uma variedade de temperaturas alvo e gamas de temperaturas sem limitação.

Vários tipos de sinais são contemplados para utilização em indicadores de temperatura da presente invenção. Por exemplo, indicadores de temperatura podem indicar a temperatura, produzindo um sinal visual (por exemplo, um mostrador digital, uma mudança de cor, um gráfico), um sinal audível, um sinal de infravermelho, um sinal de rádio, um sinal analógico, um sinal digital, ou uma combinação dos mesmos. Por exemplo, o dispositivo indicador de temperatura pode incluir um ou mais de: um display de cristal líquido (LCD) para indicar a temperatura, uma voz ou sintetizador de voz para indicar temperatura ou para especificar que um item está abaixo ou ultrapassou a temperatura alvo predeterminada, um análogo, infravermelho, ou sinal de rádio, que indica a temperatura através do som, ondas ultrassônicas ou outras ondas; e/ou um sinal digital que indica a temperatura eletronicamente.

Indicadores de temperatura que produzem indicações visuais de temperatura podem produzir um sinal que compreende uma cor que corresponde a uma temperatura do vaso e/ou conteúdo do vaso e estão dentro, acima ou abaixo de uma temperatura alvo, ou acima, abaixo ou dentro de uma faixa de temperatura alvo. A presente invenção contempla que quaisquer combinações de cor podem ser usadas com qualquer número e combinação de indicadores de temperatura, sem limitação. Um especialista na técnica pode empregar qualquer número de produtos químicos, que refletem determinadas cores a certas temperaturas e pode selecionar tais substâncias químicas de modo a refletir uma cor desejada para corresponder a uma temperatura particular.

Em modalidades ilustrativas adicionais, dispositivos de temperatura podem compreender uma ou pluralidade de faixas de temperatura cada uma compreendendo um ou mais indicadores de temperatura que indicam uma temperatura predeterminada ou faixa de temperatura. Cada indicador de temperatura dentro de uma escala de temperatura pode produzir um sinal (por exemplo, sinal visual, sinal digital).

Escalas de temperatura ilustrativamente incluem indicadores de temperatura em incrementos de 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, 10°C, ao longo intervalos de 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C, 100 C °, 110°C, 125 C °, 130°C, 140 C °, 150°C, 160°C, 170°C, 180°C, 190°C, 200°C ou mais.

Faixas de temperatura ilustrativas incluem, entre outras, faixa de cerca de 4°C a cerca de 65°C, cerca de 4°C a cerca de 50°C, cerca de 4°C a cerca de 42°C, cerca de 4°C a cerca de 37°C ou quaisquer faixas intermediárias de temperaturas.

A presente invenção contempla, entre outras, que um dispositivo indicador de temperatura pode compreender uma ou mais escalas de temperatura, cada uma compreendendo-

do qualquer número e combinação de indicadores de temperatura, em todos os incrementos ao longo de qualquer intervalo de temperatura para indicar uma temperatura predeterminada ou faixa de temperaturas.

Em uma modalidade, dispositivos indicadores de temperatura compreendem uma pluralidade de indicadores de temperatura reversíveis cada um associado com uma faixa específica de temperatura e um ou mais indicadores de temperatura irreversíveis que indicam quando uma ou uma pluralidade de temperaturas predeterminadas foram alcançadas ou experimentadas por qualquer período de tempo predeterminado. Os indicadores reversíveis individualmente fornecem indicações visuais da temperatura em tempo real. As indicações visuais de temperatura correspondem a uma temperatura do vaso e/ou conteúdo do vaso que estão na temperatura, acima ou abaixo de uma temperatura alvo, ou acima, abaixo ou dentro de uma faixa de temperatura alvo. Um indicador irreversível mantém uma indicação visual, uma vez que a temperatura predeterminada tenha sido atingida.

A presente invenção contempla ainda um vaso compreendendo um ou mais dispositivos indicadores de temperatura e um ou mais dispositivos de tempo decorrido ou dispositivos que indicam várias condições ambientais.

Como usado aqui, o termo "dispositivo indicador de tempo decorrido" refere-se a um dispositivo compreendendo um ou uma pluralidade de "indicadores de tempo decorrido." Como usado aqui, o termo "indicador de tempo decorrido" refere-se a um indicador de que mede, monitora, e indica quando um período predeterminado de tempo tenha decorrido. Cada indicador de tempo decorrido pode ser independentemente ativado pelo usuário ou por exposição a uma temperatura específica predeterminada ou faixa de temperatura.

Uma vez ativado, um indicador de tempo decorrido indica o tempo desde a ativação. Em uma modalidade, um determinado indicador de tempo decorrido mede uma quantidade predeterminada de tempo e, em seguida, produz um sinal que indica quando o período de tempo predeterminado tiver passado. Em várias modalidades ilustrativas, um dispositivo indicador de tempo decorrido compreende 1, 2, 3, 4, 5, ou mais indicadores de tempo decorrido, cada um sendo individualmente capaz de ativação independente por um usuário ou por exposição à mesma ou a uma diferente temperatura predeterminada ou faixa de temperaturas.

Em várias modalidades, a presente invenção contempla, em parte, um vaso compreendendo um indicador de tempo decorrido que indica o tempo que o vaso e/ou conteúdo do vaso tenha sido exposto, experimentado, ou mantido em uma ou pluralidade de temperaturas predeterminadas ou faixa de temperaturas. Em uma modalidade relacionada, o indicador de tempo decorrido indica uma quantidade predeterminada de tempo, que os vasos, e/ou seus conteúdos tenham sido expostos, experimentados ou mantidos em uma ou pluralidade de temperaturas predeterminadas ou faixa de temperaturas. O indicador de tempo

decorrido pode produzir um sinal contínuo ou uma pluralidade de sinais em pontos onde um percentual predeterminado do tempo total predeterminado tenha decorrido, por exemplo, produz um sinal em intervalos regulares do tempo total decorrido a ser medido.

Em uma modalidade, um indicador de tempo decorrido produz um sinal em intervalos regulares do tempo total a ser medido. Por exemplo, se o indicador de tempo decorrido é projetado para medir e indicar um tempo total de uma hora, o indicador pode produzir um sinal para indicar o ponto em que 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, e uma hora tiverem decorrido. Exemplos de intervalos regulares incluem intervalos de 1 minuto, intervalos de 2 minutos, intervalos de 5 minutos, intervalos de 10 minutos, intervalos de 15 minutos, intervalos de 20 minutos, intervalos de 30 minutos, intervalos de 45 minutos, intervalos de 60 minutos, intervalos de 90 minutos, intervalos de 120 minutos ou mais. Exemplos de números de intervalos regulares, dentro de qualquer período de tempo total decorrido incluem 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais intervalos.

Em outra modalidade, um indicador de tempo decorrido produz um sinal contínuo, indicando a quantidade de tempo que decorreu ou que ainda tem a decorrer (ou seja, o tempo restante). Por exemplo, um indicador de tempo decorrido que é projetado para medir e indicar um tempo total de uma hora pode estar na forma de uma barra de progresso, gráfico de pizza ou relógio, onde um sinal é produzido sob ativação e aumenta linearmente comparado à fração do tempo total decorrido que tenha decorrido. Em uma modalidade, uma vez que o tempo total tenha decorrido o indicador de tempo decorrido pode interromper a produção de sinal ou produzir um sinal diferente para indicar que o tempo total tenha decorrido.

Em uma modalidade ilustrativa particular o dispositivo indicador de tempo decorrido compreende uma ou uma pluralidade de qualquer combinação de indicadores de tempo decorrido. Cada indicador de tempo decorrido pode ser independentemente ativado pelo usuário ou ativado por exposição a uma temperatura predeterminada diferente. Além disso, cada indicador de tempo decorrido pode medir e produzir um sinal para diferentes períodos predeterminados de tempo.

Meramente para fins de ilustração, um único dispositivo indicador de tempo decorrido pode incluir: um indicador de tempo decorrido que é ativado pelo usuário e mede e indica um tempo decorrido de 1 hora; um indicador de tempo decorrido que é ativado pelo usuário e mede e indica um tempo decorrido de 2 horas; um indicador de tempo decorrido que é ativado pelo usuário e mede e indica um tempo decorrido de 10 minutos; um indicador de tempo decorrido que é ativado por exposição a uma temperatura predeterminada, de 4°C e mede e indica um tempo decorrido de 1 hora, 2 horas ou mais desde a ativação; e/ou indicador de tempo decorrido que é ativado por exposição a uma temperatura predeterminada na faixa de 30°C-40°C, preferencialmente 37°C e mede e indica um tempo decorrido de 1

hora, 2 horas, ou mais desde a ativação.

Exemplos de tipos de sinais produzidos pelos indicadores de tempo decorrido incluem, entre outros, sinais visuais, sinais sonoros, sinais infravermelhos, sinais de rádio, sinais digitais, sinais analógicos, e combinações dos mesmos.

5 A presente invenção ainda contempla, em parte, vasos compreendendo um dispositivo indicador compreendendo um ou mais indicadores ambientais que medem, monitoram e indicam, por exemplo, pH, concentração de dióxido de carbono, concentração de oxigênio, osmolaridade ou concentração de glicose do conteúdo do vaso. Em uma modalidade, um indicador ambiental monitora continuamente e produz um sinal que indica a condição ambiental. Em outra modalidade, um indicador ambiental monitora e produz um sinal em um ou mais tempos predeterminados, e/ou em intervalos regulares. O sinal preferencialmente é um sinal visual, preferencialmente um sinal alfanumérico produzido em um LED, OLED, ou LCD.

10 Em várias modalidades, indicadores ambientais compreendem sensores digitais que medem, monitoram e indicam as condições ambientais no vaso. Além disso, é contemplado que os sensores podem ser calibrados para medir qualquer faixa de condições ambientais, entre outros. Assim, a faixa normal para cada condição ambiental pode ser pré-programada em cada dispositivo indicador ambiental. A faixa pode incluir um ou mais de um limite mínimo, condição ideal, ou um limite máximo. Em uma modalidade particular, quando as condições ambientais a serem medidas ou monitoradas estão fora dos valores dos limites 15 mínimos ou máximos, o indicador do ambiente irá produzir um sinal audível para indicar que a condição ambiental não está dentro de uma faixa aceitável.

20 Outros exemplos de indicadores ambientais incluem, entre outros, concentrações de  $\text{Ca}^{++}$ , potássio, sódio, magnésio, manganês, sulfato, fosfato, cloreto.

25 A presente invenção contempla, em parte, os vasos compreendendo uma combinação de dispositivos indicadores, que indicam, por exemplo, a temperatura do conteúdo do vaso, o tempo que o vaso esteve em uma dada temperatura e, opcionalmente, uma ou várias condições ambientais (por exemplo, pH, concentração de oxigênio, concentração de glicose). Em modalidades preferenciais, dispositivos de combinação podem incluir características individuais dos dispositivos indicadores aqui revelados. Um especialista na técnica 30 apreciará que os dispositivos indicadores ambientais estão preferencialmente em contato com o conteúdo do vaso. Os dispositivos contemplados podem ser integrados no material do vaso em um ponto onde a permeabilidade do vaso é tal que o dispositivo de detecção ambiental particular em contato está em contato com o lúmen do vaso ou conteúdo do vaso. Em outra modalidade, os dispositivos indicadores ambientais podem ser fabricados separadamente do vaso e, subsequentemente, de forma permanente ou não permanente afixados ou 35 aderidos à superfície exterior do vaso. Em uma modalidade relacionada, o dispositivo afixado ou aderido perfura o vaso de modo que o dispositivo sensor ambiental particular está em

contato com lúmen do vaso ou conteúdo do vaso. Em outra modalidade relacionada, o dispositivo afixado ou aderido é aplicado a uma parte do dispositivo que é permeável, de modo que o dispositivo sensor ambiental particular está em contato com o lúmen do vaso ou conteúdo do vaso.

5 Em uma modalidade preferencial o vaso compreende uma combinação de um dispositivo indicador de temperatura e um dispositivo indicador de tempo decorrido, separadamente, como dispositivos individuais ou como um único dispositivo. Em modalidades adicionais, o vaso compreende uma combinação de um dispositivo indicador de temperatura, um dispositivo indicador de tempo decorrido e um ou mais dispositivos indicadores ambientais  
10 ou separadamente, como dispositivos individuais ou como um único dispositivo.

O dispositivo que indica a combinação pode ser fabricado integralmente com o vaso, pode ser permanentemente ou não permanentemente anexado à superfície exterior do vaso, pode ser laminado à superfície exterior do vaso ou pode ser encerrado com o vaso dentro de um revestimento do vaso. O dispositivo pode ser um pequeno dispositivo eletrônico, uma sonda, um sensor, ou uma combinação dos mesmos.  
15

A combinação de dispositivos indicadores pode ser de qualquer forma ou tamanho. Exemplos de formas de combinação de dispositivos indicadores incluem entre outras: cartões, fitas, discos, adesivos, etiquetas, sondas, combinações dos mesmos. Por exemplo, um dispositivo indicador de temperatura sob a forma de um cartão ou fita pode compreender 20 uma ou uma pluralidade de discos indicadores de temperatura ou vice-versa.

Como será claro para um especialista na técnica, os vários tipos de desenho gráfico podem ser utilizados para visualizar a temperatura e o tempo decorrido do vaso, incluindo, entre outros, as várias linhas, curvas, elipses, retângulos ou pontos. Da mesma forma, os indícios que mostram o progresso da migração de líquido podem também ser utilizados, 25 incluindo, entre outros, várias setas curvas, linhas, e pontos de diferentes tamanhos. Por exemplo, o sinal pode ser visto em uma janela contínua como o progresso em uma barra de progresso ou em uma pluralidade de janelas visíveis em intervalos específicos de tempo decorrido para temperaturas particulares ou uma faixa de temperaturas. Além disso, cada modalidade pode ser adaptada de modo a incluir vários indícios adicionais para mostrar o 30 estado do indicador de tempo ou temperatura do vaso. Tais indícios incluem símbolos gráficos que mostram o avanço gradual para o tempo total decorrido em função da temperatura.

Em uma modalidade preferencial, o vaso compreende uma combinação de um dispositivo indicador de temperatura e um dispositivo indicador de tempo decorrido.

Como usado aqui, as formas singulares "um", "uma" e "o/a" incluem referências plurais a menos que o conteúdo especifique claramente de outra forma.  
35

Ao longo desta especificação, a menos que o contexto requeira de outra forma, as palavras "compreender", "compreende" e "compreendendo" serão entendidas como envol-

vendo a inclusão de uma etapa declarada ou elemento ou grupo de etapas ou elementos, mas não a exclusão de qualquer outra etapa ou elemento ou grupo de etapas ou elementos. Por "que consiste de" entende-se, incluindo, entre outros, o que quer que siga a frase "que consiste de". Portanto a frase "que consiste de" indica que os elementos listados são necessários ou obrigatórios, e que nenhum outro elemento pode estar presente. Por "consiste essencialmente de" significa incluindo quaisquer elementos listados após a frase e, limitada a outros elementos que não interferem com ou contribuem para a atividade ou ação especificada na revelação para os elementos listados. Assim, a frase "que consiste essencialmente de" indica que os elementos listados são necessários ou obrigatórios, mas que não existem outros elementos opcionais e podem ou não estar presentes, dependendo se eles afetam ou não a atividade ou ação dos elementos listados.

Referência ao longo desta especificação como "uma modalidade" ou "uma modalidade" significa que um determinado recurso, estrutura característica descrita em conexão com a modalidade é incluído em pelo menos uma modalidade da presente invenção. Assim, o surgimento de frases "em uma modalidade" ou "em uma modalidade" em vários lugares ao longo desta especificação não estão necessariamente todos se referindo a mesma modalidade. Além disso, os recursos particulares, estruturas, ou características podem ser combinados de qualquer forma apropriada, em uma ou mais modalidades.

#### EXEMPLOS

20 A análise de vários parâmetros biológicos de populações de células-tronco hematopoiéticas progenitoras tratadas com agentes que estimulam a via da prostaglandina, a fim de desenvolver métodos clínicos para aumentar o potencial de enxerto e a expansão das células foi conduzido (ver Figura 2). Os resultados destes experimentos e os resultados para os ensaios clínicos da fase 1B são descritos abaixo.

25 EXEMPLO 1

#### ENSAIOS COMPETITIVOS cAMP

O ensaio cAMP foi realizado em células CD34<sup>+</sup> usando o kit de detecção LANCE ® cAMP (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 3.000 células CD34<sup>+</sup> (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) foram distribuídas em cada poço de uma placa branca opaca de 384 poços no tampão de estimulação recomendado. Os ensaios foram realizados em triplicata para todas as condições.

30 Células CD34<sup>+</sup> foram colocadas em gelo antes de serem estimuladas com DMSO ou 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 4°C. Para os ensaios realizados em outras temperaturas, por exemplo, 25°C ou 37°C, DMSO ou 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> foi adicionado às células CD34<sup>+</sup> em temperatura ambiente, e em seguida, as placas foram incubadas com DMSO ou 16,16-dmPGE<sub>2</sub> à temperatura experimental (25°C ou 37°C).

35 Células CD34<sup>+</sup> foram incubadas durante períodos de 5, 15, 30, 60 ou 120 minutos.

Após o período de incubação, o tampão de detecção foi adicionado às células estimuladas e as células foram incubadas durante uma hora adicional em temperatura ambiente em tampão de detecção, independentemente da temperatura de estimulação. As placas de ensaio foram analisadas utilizando um EnVision ® 2104 Multilabel Reader (Perkin Elmer) de acordo com as instruções do fabricante.

Um ensaio de cAMP competitivo foi realizado utilizando células CD34<sup>+</sup> para determinar o efeito do tempo (incubação por 15, 30, 60, ou 120 minutos), da temperatura (incubação a 4°C, 25°C, ou 37°C), e concentração final de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> (1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM UO) sobre a produção de cAMP nas células.

Os resultados mostraram que a resposta cAMP máxima ocorreu em torno de 30-60 minutos de incubação, que as temperaturas mais elevadas de incubação resultaram em uma atividade cAMP mais robusta; e que a resposta de cAMP foi relativamente insensível à dose acima de um limiar de concentração de 10 µM (ver Figura 3). Um aumento estatisticamente significativo da atividade de cAMP, foi observada quando células CD34<sup>+</sup> foram incubadas com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 37°C e 25°C em comparação com o controle de DMSO, por períodos de tempo tão curtos quanto 5 min e até 2 horas, em todas as concentrações de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> testadas (1, 10, 50 e 100 µM) ( $p < 0,001$ ). Nenhum aumento estatisticamente significativo na produção de cAMP foi observado em células CD34<sup>+</sup> incubadas em 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 4°C em comparação com os controles de DMSO, sob condições semelhantes de tempo e em todas as concentrações testadas (1, 10, 50 e 100 µM) ( $p > 0,05$  para todas as amostras).

A incubação em temperaturas mais elevadas durante um período de tempo mais longo, cujas condições anteriormente acreditava-se estarem associadas com uma diminuição na viabilidade celular CD34<sup>+</sup> e meia-vida de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>, mostrou estimulação superior de cAMP sem afetar negativamente a viabilidade das células. Além disso, como aqui descrito, o tratamento das células com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 4°C por períodos de tempo mais curtos resultou em aumento da produção de cAMP, mas não resultou em aumento da expressão de genes que se acredita ser importante na regulação de retorno das células tronco, a sobrevivência, a proliferação e o enxerto. Regulação positiva de tais genes, e, assim, alcançar a resposta biológica mais robusta, demandou tratamento das células com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> em temperaturas fisiologicamente relevantes, como 37°C, por períodos maiores de tempo de pelo menos cerca de uma hora.

## EXEMPLO 2

### EXPRESSÃO GÊNICA

#### Arranjos de expressão do genoma completo

Sangue de cordão umbilical humano e células CD34<sup>+</sup> pré-isoladas de sangue de cordão umbilical humano foram adquiridos de Stem Cell Technologies Inc. (Vancouver, BC,

Canadá). As células foram incubadas em dextrano de baixo peso molecular com 5% de meio de albumina de soro humano (LMD/5% de HSA) e em meio Stem Span (Stem Cells Technology Inc.) para tratamento ex vivo com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>. O RNA total foi isolado a partir de células incubadas utilizando um Kit de Isolamento Pico Pure RNA Isolation (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

RNA amplificado biotinilado (aRNA) foi preparado usando o protocolo padrão para o Kit de Amplificação MessageAmp II aRNA (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX) e a segunda rodada de amplificação opcional, o RNA cópia (cRNA) foi transcrito em biotina marcada utilizando Kit MessageAmp II Biotin Enhanced (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX) de acordo com as instruções do fabricante. O aRNA marcado com biotina foi purificado e fragmentado de acordo com os protocolos da Applied Biosystems. 20 µg de aRNA fragmentado foi hibridizado a GeneChips Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA) por 16 horas a 45°C.

Os GeneChips foram lavados e corados no Affymetrix Fluidics Station 450 e digitalizadas no Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G. Os dados de imagem foram analisados utilizando o programa Affymetrix Expression Console e análise de configurações padrão efetuadas. Dados de expressão do GeneChip foram normalizados por análise de multiarranjo robusto em escala log (RMA) e visualizado em Spotfire para Genomics 3.1 (Tibco Spotfire, Palo Alto, CA). A análise de via foi realizada em MetaCore. (GeneGo, St. Joseph, MI).

A tecnologia GeneChip foi utilizada para determinar os efeitos do tempo (incubação durante 5, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120, 180 ou 240 minutos), temperatura (incubação a 4°C, 25°C, ou 37°C), e a concentração final de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> (0,1 µm, 1 µm, 10 µm, 50 µm, ou 100 µm) sobre a expressão do gene celular.

*qPCR Microfluídicos utilizando a plataforma Fluidigm*

Quantificação de transcrição de PCR em tempo real de amostras de células CD34<sup>+</sup> ex vivo tratadas com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> foi realizada utilizando sistema microfluídico Bio-Mark Dynamic Array (Fluidigm Corporation, South San Francisco, CA, EUA). O RNA total foi isolado a partir de células tratadas utilizando Pico Pure RNA Isolation Kit (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). DNA complementar (cDNA) foi transcrito de forma inversa a partir de 50 ng de RNA total isolado utilizando o kit de transcrição reversa High-Capacity cDNA (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA).

O cDNA foi pré amplificado por genes alvo específicos (96), utilizando uma mistura de 200 nM de 96 pares de iniciadores de genes específicos (ver tabela 1), incluindo 6 genes de controle de referência, utilizando o protocolo do Kit TaqMan Mix PreAmp Master (Life Technologies). Amplificação do alvo específico (STA) do cDNA foi realizada utilizando 14 ciclos de amplificação com as condições cíclicas padrão usando o protocolo do fabricante. O corante EvaGreen (Biotium, Inc. Hayward, CA, EUA) foi adicionado de acordo com o proto-

colo do EvaGreen Fluidigm para detectar produtos de amplificação. Para as amostras, a mistura de reação continha 3,0  $\mu$ L de Gene Expression Master Mix (Life Tech.), 0,3  $\mu$ L de tampão de carregamento de amostra (Fluidigm), 0,3  $\mu$ L 20X de corante EvaGreen (Biotium, Inc.), 1,5  $\mu$ L diluído (1:5 estéril nH<sub>2</sub>O) de STA cDNA, e 0,9  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril para carregamento das entradas de amostra do arranjo 96.96 Dynamic Array (Dynamic Fluidigm).

As amostras foram corridas em replicatas, 5 a 9 poços. Para pares de iniciadores, a mistura de reação continha 2,5  $\mu$ L de pares de Gene de iniciador específico (20  $\mu$ M) e 2,5  $\mu$ L de tampão de carregamento de ensaio (Fluidigm) para carregar nas entradas de ensaio em 96.96 Dynamic Array (Dynamic Fluidigm). 96.96 Dynamic arrays foram carregados usando um Controlador Nanoflex IFC HX (Fluidigm) e as reações em tempo real foram realizadas utilizando um Sistema BioMark Real-Time PCR System (Fluidigm).

Os resultados foram analisados utilizando BioMark Real-Time software de análise de PCR. Cts médios foram calculadas a partir das amostra das replicatas e delta-delta Cts ( $\Delta\Delta Ct$ ) foram calculados utilizando a média de 6 genes de referência (ACTB, GAPDH, HPRT1, QARS, ARPC2 e LRIG2) contra uma amostra de veículo apenas. Cts acima de 28 ou de produtos amplificados com propriedades inapropriadas de curva de fusão foram excluídas do cálculo. Os resultados são exibidos na Spotfire para Genomics 3.1 (Tibco Spotfire, Palo Alto, CA, EUA), em formato de mapa de calor ou como gráficos plotados em Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA).

20 Tabela 1: Pares de Iniciadores

Posição do poço	Nome	Sequência	Nome	Sequência
A1	AREG-F	CGGCTCAGGCCATT ATGC	AREG-R	GGTCCCCAGAAAATGGTTC A
A2	AREGB-F	TCTCCACTCGCTCT TCCAACAC	AREGB-R	ATCAAGAGCGACAGCACCA CTG
A3	ATP6V0A 4-F	TGGACGACCATGGA GAAGAGTTC	ATP6V0A4 -R	ACTCGATGGTGTGGATGGC TTG
A4	AKAP12-F	CAGAAACAAGAGAG AGAATCTGCAA	AKAP12-R	TGTCTTCACATTCTGGTCTT CCA
A5	ADCY7-F	GCACTGGAGAACTT GGGAAAAT	ADCY7-R	GCATTCACAAGAGTACCCG AGG
A6	CCND1-F	CTTCCTGTCTACT ACCGCCTC	CCND1-R	CTTGACTCCAGCAGGGCTT C
A7	C6orf176-F	TCGGACACACACAC ACACACAC	C6orf176-R	AGCAACTTCGGACTCAGAC CTC

Posição do poço	Nome	Sequência	Nome	Sequência
A8	CA2-F	GATGACTCTCAGGA CAAAGCAGTG	CA2-R	AACCTTGTCCATCAAGTGAA CCC
A9	CA4-F	AAGGTCGTCTGGAC TGTGTTCC	CA4-R	CTGAGAGAATGCCAGGATC TGTTC
A10	CREB5-F	AAGACTGCCAATA ACAGCCAT	CREB5-R	GACAGGACTAGCAGGAGG GCTA
A11	COL1A1-F	TGCGATGACGTGAT CTGTGACG	COL1A1-R	TTTCTTGGTCGGTGGGTGA CTCTG
A12	CREM-F	AAGAAGCAACACGC AAACGA	CREM-R	TTCTTCTTCTTCCTGCGAC ACT
B1	CXCL1-F	CGGAAAGCTTGCCT CAATCCTG	CXCL1-R	CAGTTGGATTTGTCAGTGTT CAGC
B2	CXCL2-F	AAACCGAAGTCATA GCCACACTC	CXCL2-R	AGCCACCAATAAGCTTCCTC CTTC
B3	CXCL5-F	AGACCACGCAAGGA GTTCATCC	CXCL5-R	TCTTCAGGGAGGCTACCAC TTC
B4	CXCL6-F	AGCTTGAGTTTCCT GCCAGTCG	CXCL6-R	TTTCCTCGTGCCTCTGCAC TC
B5	CXCR4-F	TCCTGGCTTTCTTC GCCTGTTG	CXCR4-R	TGAAGGAGTCGATGCTGAT CCC
B6	DUSP2-F	AACCAGATGGTGGA GATCAGTGC	DUSP2-R	CCGCTGTTCTTCACCCAGT CAATG
B7	DUSP4-F	TGCATCCCAGTGGA AGATAACCAC	DUSP4-R	GCATCGATGTACTCTATGG CTTCC
B8	ECEL1-F	GACTTCCTGCTGAA ACCCGATG	ECEL1-R	GGTCTTCTCATGGACCTCAA ACTC
B9	EDN1-F	ATTTGGGTCAACAC TCCCGAGCAC	EDN1-R	TCACGGCTGTTGCCTTGT GG
B10	ETV3-F	ATGAAAGCCGGCTG TAGCATCG	ETV3-R	CAGGAAACTGATAACCCTCC ACCTC
B11	GULP1-F	GCAGCAGATTCCC TCCAGATA	GULP1-R	TGTCTAACGGGTCGAGACA AAA
B12	FGF9-F	TCGGTGTGGCATT GTCTCTTG	FGF9-R	ACTGGATGCAAACCCATGA GCTG

Posição do poço	Nome	Sequência	Nome	Sequência
C1	FGFR1-F	ATACCAGCTGGATG TCGTGGAG	FGFR1-R	ACATGAACCTCCACGTTGCTA CCC
C2	FLJ27352-F	TCACCGGCTTCTT GCCATCTG	FLJ27352-R	TTCTTATCCCGGTTGCGGTC TG
C3	FOS-F	TACACTCCAAGCGG AGACAGAC	FOS-R	GTTGGCAATCTCGGTCTGC AAAG
C4	FOSL2-F	GCAGTTGGTTCT GGCTTGAG	FOSL2-R	TCCTGCTACTCCTGGCTCAT TC
C5	FOXA1-F	TCCTCAGGAATTGC CCTCAAGAAC	FOXA1-R	ATGACATGACCATGGCACT CTGC
C6	GEM-F	GCCGAGAAGTGTCT GTATCAGAAC	GEM-R	CTGTCGCACAATGCCCTCA AAC
C7	GNAL-F	AGAACATCGACAGCGT CAGCTTGG	GNAL-R	TGGCCACCAACATCAAACAT GTGG
C8	HAS1-F	GCCTGGTACAACCA GAAGTTCC	HAS1-R	ACCTGGAGGTGTACTTGGT AGC
C9	HOMER1-F	AGAACAGCTCGAC TAGCAAAGG	HOMER1-R	GCGGATTCTGTGAAGGTG TACTG
C10	HR-F	AGGACCAAGAGCAT CAAAGAGGAG	HR-R	TGTATTGCTCATGGCCCAA GC
C11	IL11-F	AGCGGACAGGGAA GGGTTAAAG	IL11-R	GGCGGCAAACACAGTTCAT GTC
C12	INHBA-F	TCACGTTGCCGAG TCAGGAAC	INHBA-R	TGACAGGTCACTGCCTTCC TTG
D1	JAG1-F	TGGGCCGACTGC AGAATAAAC	JAG1-R	ATCCACACAGGTCGCTCCA AAG
D2	JOSD1-F	TCCAGGACAGCAAT GCCTTCAC	JOSD1-R	CATGGTGTTGGAGACAAC CTCTG
D3	KCTD20-F	TCTAGGTCCCAGGA ATGAAGACCC	KCTD20-R	GGAACAGGAAAGATTTGCTGG CTGAG
D4	KIAA1199-F	TTGGCCTCCTGTC AAGTCTGG	KIAA1199-R	ATCCAGAAGGTGGACACAG CATTTG
D5	LGALS12-F	CGGGAATGAGGAA GTGAAGGTGAG	LGALS12-R	AGCGTGTCCACATGAGACA GTG

Posição do poço	Nome	Sequência	Nome	Sequência
D6	LIF-F	TGCTTCATCCGGCT TAGCTTGG	LIF-R	AGTTTGCTTTCTCGAAGCC CATC
D7	LONRF2-F	AGGGTCACAGCCAC ATGAATGC	LONRF2-R	AATTCTCCGAGCTCCCTGC ATC
D8	LXN-F	ACAAGTTAAGGTGA ACTGCACAGC	LXN-R	TGCAGTTCTTGTCCC GTTG AAGG
D9	MALT1-F	TGGTCACAGCTGGA TGTTTGCG	MALT1-R	TCAGAGACGCCATCAACAC TTCTC
D10	MPPE1-F	TGGCTGACACCCAT TTGCTTGG	MPPE1-R	TCTCCATCTGCCATTCCCTT CG
D11	MYOM2-F	TGACCATCATGGAA GGGAAGACC	MYOM2-R	CTGGATGTCCTGGTCGTT TTG
D12	NPTX1-F	ATCAGCGAGCTCGA GAAAGGTC	NPTX1-R	TAGTTGGTCCGCAGTGGGA ATG
E1	NR4A2-F	GCTGTTGGGATGGT CAAAGAAGTG	NR4A2-R	TCTTCGGTTTCGAGGGCAA ACG
E2	NR4A3-F	TGCGTCCAAGCCCA ATATAGCC	NR4A3-R	TGTATGTCCTGCGCCGCATA ACTG
E3	PLAT(2)-F	GTGTGCTGGAGACA CTCGGA	PLAT(2)-R	CATCGTTAGACACACCAG GG
E4	NTRK1-F	AGCACCGACTATT CCGTGTGG	NTRK1-R	TCGGTGGTGAACCTACGGT ACAGG
E5	OSM-F	TGCCTGTCGGTTGC TTGGATT	OSM-R	TGCACCACCTGTCCCTGATTT ACAG
E6	PCDH8-F	TCATCAACCACATG CAGAGTGGAC	PCDH8-R	AAGGTTGACATCTGGGCTG GTG
E7	PDE4A-F	TCCACAAACATTCC GGACAAACAG	PDE4A-R	TTCCCTTCATCGTGGGTGATG GG
E8	PDE4B-F	ACAAGTTCAAGGC TCTTCTCC	PDE4B-R	CCATGTTGCGAAGGACCTG AATG
E9	PDE4D-F	TTGTGACTCCATT GCTCAGGTC	PDE4D-R	GATGGATGGTTGGTTGCAC ATGG
E10	PDLIM3-F	ACAAATGTGGGAGT GGCATAGTCG	PDLIM3-R	ACTCAGGGTGCCGGTACTT ATC

Posição do poço	Nome	Sequência	Nome	Sequência
E11	PLAT-F	TCTCAGATTCGTG TGCCAGTGC	PLAT-R	GCACGTGGCCCTGGTATCT ATTTCT
E12	PLAUR-F	ATCGTGCCTGTG GGAAGAAG	PLAUR-R	ACCCACACACAAACCTCGGT AAG
F1	PLK2-F	TGGAGGAGAACCTC ATGGATGG	PLK2-R	TTAGCCACTGAAGGAGGTA GAGC
F2	PPARD-F	TCCTTCCAGCAGCT ACACAGAC	PPARD-R	ATCTGCAGTTGGTCCAGCA GTG
F3	RASD1-F	AGGCTTCAAGAAC CGTCATGC	RASD1-R	ACAGCAACCCGGAATCACA GAC
F4	PTGER2-F	TCCTGGCTATCATG ACCATCAC	PTGER2-R	TTCGGGAAGAGGTTTCATTCT AT
F5	REN-F	TGTACCTTGGTCT CCCGACAG	REN-R	GGGCATTCTCTTGAGGAAG ATCCG
F6	RGS1-F	TGCTGCTGAAGTAA TGCAATGGTC	RGS1-R	TGACCAGTTGGTGGCAA GAAG
F7	RGS2-F	CAAACAGCAAGCTT TCATCAAGCC	RGS2-R	AAGCCCTGAATGCAGCAAG ACC
F8	S1PR1-F	ACGTAGGCTGTGG GAAGATGAAG	S1PR1-R	TGGAAACTTGGCCTCAGC GAAG
F9	SC5DL-F	AAGCGCCTACATAA ACCTCACC	SC5DL-R	AGCATGACTTGCAAATGGA GTAGG
F10	SGIP1-F	AAGGAGCAGACCCA AGCAAATG	SGIP1-R	GCCAGCAGGAAATGACAAC ACC
F11	SGK1-F	AGGAGCCTGAGCTT ATGAATGCC	SGK1-R	TGATTTGCTGAGAAGGACTT GGTG
F12	SHISA2-F	ACTATCACCCGCTG CTTCTCTG	SHISA2-R	CGCCAAACCATAACCACAA GGC
G1	SIK1-F	ACTCACCGCGCCAT GTATAGTC	SIK1-R	ACAACTGTCAGAGCTGGTT CCC
G2	SSTR1-F	ATGGTGACAGGTGT GAGTCTGG	SSTR1-R	TTGAGTGCTGCTTGCACTC CTG
G3	SV2C-F	TGTCTGCTCTGCTG ATGGACAG	SV2C-R	AAGCACCATAGAGCCACCT AGC

Posição do poço	Nome	Sequência	Nome	Sequência
G4	SYT4-F	CACCAGCCGGAA GAATTTGATG	SYT4-R	GTGAAGACCAGGCCAAATG CAC
G5	SYTL3-F	GAATGAACGACCGC TTGCTTGG	SYTL3-R	CCAACAGCTGTGTCTCCCTT TG
G6	TAC1-F	TACGACAGCGACCA GATCAAGGAG	TAC1-R	TCCAAAGAACTGCTGAGGC TTGG
G7	THBS1-F	GGCAGACACAGACA ACAATGGG	THBS1-R	TGTCCCCTTCATTGAGGATA CCG
G8	PTGER4-F	TCTTACTCATTGCCA CCTCCCT	PTGER4-R	TGGCTGATATAACTGGTTGA CGA
G9	TMCC3-F	TTCAGCCGGTGAGG CTGTTATC	TMCC3-R	GGCAAGGCAATAAACACAG AGTGG
G10	TNFRSF1B-F	TGTCCACACGATCC CAACACAC	TNFRSF1B-R	TGTCACACCCACAATCAGTC CAAAC
G11	ULBP2-F	GCTCTCCTTCCATC AAGTCTCTCC	ULBP2-R	GCACAGAAGGATCTTGGTA GCG
G12	VPS37B-F	ATGGTGCAGAAGAT GGAGGAGAC	VPS37B-R	GGTCAAGCGTGCTTCAAC GTG
H1	WT1-F	TGTCCCACTTACAG ATGCACAGC	WT1-R	ACACTGGAATGGTTACAC CTG
H2	YPEL4-F	TCACCGCACTTACA GCTGTGTC	YPEL4-R	ATGGCTCCCTTGGAGGAC TTG
H3	PDE3B-F	TGATGAAGACGGTG AAGAATTAGA	PDE3B-R	AGGTGGTGCATTAGCTGAC AAA
H4	ZNF331-F	AACAATGGCCCAGG GTTTGGTG	ZNF331-R	TACAGGTCCCTCTGAGCAG AGTTC
H5	TGFB2-F	AGCATGCCGTATT TATGGAGT	TGFB2-R	GCAGATGCTTCTGGATTAT GG
H6	TCF4-F	ATCGAATCACATGG GACAGATG	TCF4-R	GCTGTTAAGGAAGTGGTCT CTTG
H7	ACTB-F	TGGCCGAGGACTTT GATTGCAC	ACTB-R	GGACTTCCTGTAACAACGC ATCTC
H8	ARPC2-F	AGGTGAACAACCGC ATCATCGAG	ARPC2-R	TACTGTTCCGGTTTGTTC CG

Posição do poço	Nome	Sequência	Nome	Sequência
H9	GAPDH-F	AGCTCATTCCCTGG TATGACAACG	GAPDH-R	CTCTTCCTCTTGCTCTTG CTG
H10	HPRT1-F	TGCAGACTTTGCTT TCCTGGTC	HPRT1-R	CAAGCTTGCGACCTTGACC ATC
H11	LRIG2-F	TGGCAACAGCTGAC AGAAATGGG	LRIG2-R	ACAAGCAGATGCACACCAG AGC
H12	QARS-F	AGGTTCCCTTGCA CCCATTGTC	QARS-R	TTAAATCCTGGCTCTGGCTC CTC

Assinatura de Expressão do Gene 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>

Uma assinatura de expressão de gene em linha de base de células CD34<sup>+</sup> tratadas com 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> por 120 minutos a 37°C em comparação com células CD34<sup>+</sup> tratadas com veículo foi obtido (ver Figura 4). Um total de 608 genes foi modulado em um nível estatisticamente significativo (365 regulado para cima ou 243 regulação para baixo) em células CD34<sup>+</sup> tratadas sob estas condições. CXCR4, um mediador conhecido de HSC retorno para o nicho de medula óssea através da sua interação com o SDF-1α foi regulada positivamente até 18 vezes em relação aos tratados com o DMSO controle. CREM também foi regulado positivamente, um dos muitos conhecidos genes responsivos de cAMP.

10 A modulação da expressão dos genes associados com vias de sinalização de PGE<sub>2</sub>, adesão celular, e sinalização de quimiocinas também foi observada. No entanto, não foi observado aumento na expressão do gene associado com apoptose ou morte celular

O perfil de expressão do gene para as células CD34<sup>+</sup> tratadas com 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> por 120 minutos a 37°C em comparação com DMSO controle distingue as células da presente invenção de outras células conhecidas. Os métodos da invenção produzem células que apresentam enxerto ou potencial de enxerto aumentado ou melhorado e aumentou a expansão *in vivo* em comparação com o controle, células não tratadas ou células tratadas a 4°C. Uma tabela de genes na assinatura de expressão do gene das células da invenção que mostram alta amplitude de regulação aparece abaixo.

20

Tabela 2: Genes altamente regulados em uma assinatura de expressão do gene dmPGE<sub>2</sub>

Símbolo do Gene	Descrição	Veze de mudança (aumento)
HAS1	Hialuronano sintase 1	55.83
GEM	protein GEM de ligação a GTP	28.18
DUSP4	Proteína fosfatase dupla específica	25.75

	cidade 4	
AREG	Anfiregulina	23.32
NR4A2	Receptor Nuclear relacionado a proteína 1	22.30
REN	Renina	19.50
CREM	Modulador responsivo do elemento cAMP	12.90
COL1A1	Colágeno, tipo I, alfa 1	10.50
FOSL2	Antígeno 2 relacionado a Fos	8.11
CXCR4	Receptor da quimiocina CXC4	7.33

Assim, ao contrário dos protocolos pré-clínicos, a incubação a 37°C, que anteriormente pensava-se estar associada com uma diminuição na viabilidade de células CD34<sup>+</sup> e meia-vida de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>, inesperadamente mostrou um aumento na expressão do gene associado com vias de sinalização celular PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub>/R<sub>4</sub>, retorno celular, e proliferação.

5 Além disso, não foram observadas alterações da expressão do gene que indicariam uma diminuição da viabilidade celular.

Outros experimentos foram realizados para determinar se células CD34<sup>+</sup> responderiam a 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>, quando as células fossem tratadas no contexto de um conjunto de protocolo de tratamento clínico de sangue de cordão. células humanas de sangue de 10 cordão umbilical foram incubadas durante 120 minutos a 37°C com veículo ou 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> (Ver Figura 17). Após a incubação, células Lin(-) CD34<sup>+</sup> foram isoladas utilizando separação magnética Miltenyi. O aRNA marcado com biotina foi preparado a partir das células, e os perfis de expressão de genes foram analisados. Consistente com os resultados para as células CD34<sup>+</sup> de sangue de cordão incubadas em concentrações diferentes de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>, células Lin (-) CD34<sup>+</sup> isoladas de sangue de cordão humano reproduziram a assinatura de expressão do gene 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>. O aRNA das células de sangue de cordão total, de células Lin (+) CD34<sup>+</sup>, células Lin (-) CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>, e a partir de células Lin(-) CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> foram também preparados. A Figura 17 mostra que sangue total de cordão (mais de 99% células Lineage +) não responderam a 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> de maneira semelhante às células Lin (-) CD34<sup>+</sup> isoladas a partir de sangue total de cordão ou a partir de células Lin (+) CD34<sup>+</sup>.

#### Parâmetros de Tempo

Perfis de expressão de genes foram analisados para células CD34<sup>+</sup> incubadas com 10 uM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 37°C durante 5, 15, 30, 60, ou 120 minutos. Para períodos de incubação (por exemplo, tratamento) de menos de 120 minutos, as células foram lavadas em meio para remover o 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> e, em seguida, as células foram incubadas du-

rante o período restante em meio para propiciar tempo para que as alterações na expressão de genes ocorressem (ver a Figura 5).

Os resultados mostraram que exposições mais longas a 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> produziram magnitudes maiores de expressão do gene na assinatura de expressão em 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> (Ver Figura 6). Em contraste, os períodos de incubação muito curtos (5-15 minutos), resultaram em alterações mínimas de expressão dos genes nos genes associados com assinatura de expressão em 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>. Alterações de expressão de genes foram aparentes após 30 minutos de incubação com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>, mas continuaram a aumentar até 120 minutos de incubação, não obstante o fato de que todos os ensaios foram avaliados após um total de 120 minutos de tempo decorrido.

Isto está em contraste com as observações anteriores que sugeriram que os tempos de incubação de curta duração deveriam ser suficientes para carregar os receptores EP<sub>2/4</sub> com a droga, antes do transplante, onde se acreditava que a biologia a jusante ocorreria. Os resultados atuais mostram que os períodos de incubação mais longos (mais de 30 minutos) são necessários para temperaturas fisiologicamente relevantes, como a 37°C, para se conseguir o benefício biológico.

Uma plataforma de qPCR microfluidica também foi utilizada para medir as alterações de expressão da assinatura de expressão do gene em 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> dos genes listados na Tabela 3 em células humanas CD34<sup>+</sup> em diferentes períodos de incubação. A análise da expressão do gene inclui um formato de 96 poços para detectar os genes listados na Tabela 3.

Tabela 3: Assinatura de Genes para ensaio Fluidigm

ADCY7	CXCL1	FGFR1	INHBA	MYOM 2	PLAT (1)	SC5DL	THBS1
AKAP12	COL1A1	FLJ27352	JAG1	NPTX1	PLAT (2)	SGIP1	TMCC3
AREG	CXCL2	FOS	JOSD1	NR4A2	PLAUR	SGK1	TNFRSF1B
AREGB	CXCL5	FOSL2	KCTD20	NR4A3	PLK2	SHISA2	ULBP2
ARPC2	CXCL6	FOXA1	KIAA119 9	NTRK1	PPARD	SIK1	VPS37B
ATB6V0A4	CXCR4	GEM	LGALS1 2	OSM	PTGER2	SSTR1	WT1
C6orf176	DUSP2	GNAL	LIF	PCDH8	PTGER4	SV2C	YPEL4
CA2	DUSP4	GULP1	LONRF2	PDE3B	RASD1	SYT4	ZNF331
CA4	ECEL1	HAS1	LRIG2	PDE4A	REN	SYTL3	ACTB
CCND1	EDN1	HOMER1	LXN	PDE4B	RGS1	TAC1	GAPDH
CREB5	ETV3	HR	MALT1	PDE4D	RGS2	TCF4	HPRT1

CREM	FGF9	IL11	MPPE1	PDLIM 3	S1PR1	TGFB2	QARS
------	------	------	-------	------------	-------	-------	------

A Figura 14A mostra que assinaturas de expressão apropriadas eram detectáveis após 60 minutos de exposição constante a 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 37°C até pelo menos cerca de 4 horas de exposição constante a 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 37°C. No entanto, a resposta máxima de expressão do gene foi observada após pelo menos cerca de duas horas de exposição constante a 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 37°C. Figura 14B mostra a média da expressão do gene para os marcadores moleculares listados na Tabela 3 e expressão máxima de genes foi observada após pelo menos cerca de 2 horas a 37°C. Figura 14C mostra os dados de expressão de CXCR4, que é responsável pelo retorno para o nicho de medula óssea. É interessante notar que a cinética de resposta da expressão do gene é muito mais lenta em comparação com a resposta do AMPc, que atingiu níveis máximos em apenas 15 minutos a 37°C. Para os dados mostrados na Figura 14, o gene de expressão de reações de detecção para o seguinte grupo de genes falhou e foram excluídos da análise: ARPC2, SSTR1, CXCL5, SYT4, CXCL6, TMCC3, FGF9, nal, GULP1, LRIG2, PDE4D, PLAT (1), e PLAT (2). Para os dados mostrados na Figura 14, os seguintes genes housekeeping de controle foram utilizados: ACTB, GAPDH, HPRT1, e QARS.

Além disso, assinaturas de expressão do gene foram medidas nas células que receberam tratamentos curtos de pulso com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> seguidos por um período da recuperação na ausência da droga. células humanas CD34<sup>+</sup> foram incubadas durante diferentes momentos na presença de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> seguido por um período de lavagem e recuperação em meios designados para refletir o ambiente *in vivo*. O delineamento experimental corresponde ao paradigma de tratamento *ex vivo* onde as células são tratadas, lavadas para remover a droga e então administradas ao paciente. células CD34<sup>+</sup> foram incubadas com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 37°C por 5, 15, 30, 60, ou 120 minutos e as assinaturas de expressão do gene foram analisadas. Para períodos de incubação menores que 120 minutos, as células foram lavadas em meios para remover o 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> e, em seguida, as células foram incubadas durante o período restante nos meios para permitir ocorrer a expressão gênica.

A Figura 15 mostra que os tratamentos curtos de pulso com o 16,16 dimetil PGE<sub>2</sub> (5-15 minutos) não são suficientes para gerar uma resposta “completa” da expressão do gene. Alterações de expressão do gene e assinaturas de expressão do gene reconhecíveis só foram observadas após cerca de 30 minutos de incubação com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> e foram máximas após cerca de 2 horas, o que está em contraste com a resposta rápida do cAMP (ver Fig. 3: Assim, em modalidades clínicas particulares, o sangue de cordão tratado com os 16,16 dimetil PGE<sub>2</sub> sob condições fisiológicas (por exemplo, 37°C) por 120 minutos

conseguem uma assinatura da expressão do gene “robusta” indicativa da eficácia clínica melhorada das células tratadas.

Para os dados mostrados na figura 14, as reações da detecção da expressão do gene para o seguinte grupo dos genes falharam e foram excluídas desta análise: ADCY7, 5 CCND1, CREB5, GULP1, MPPE1, PDE3B, PTGER2, RGS2, e YPEL4. Para os dados mostrados em figura 14, os seguintes genes housekeeping controle foram usados: ACTB, ARPC2, GAPDH, HPRT1, LRIG2, e QARS.

Concentração de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>

Os perfis da expressão do gene foram analisados para células CD34<sup>+</sup> incubadas 10 por 120 minutos a 37°C com concentrações diferentes de 16,16 dimetil PGE<sub>2</sub> (veículo, 100 nanômetros, 1 µM, µM 10, ou µM 100; ver figura 7). Os resultados mostraram que a assinatura completa da expressão do gene 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> foi reproduzida em 10 µM, mas que mudanças substanciais adicionais na assinatura de expressão do gene ocorreram acima de 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>, sugerindo que 10 µM é a dose ideal de tratamento.

15 Estes experimentos foram repetidos usando células totais de sangue de cordão humano para determinar se os resultados de expressão de CD34<sup>+</sup> podem ser traduzidos para o ambiente clínico. Tratamento de cordões totais leva em conta (1) aumento da complexidade celular presente no sangue total do cordão umbilical, (2) redução dos níveis de droga devido a ligação da proteína à droga e (3) possíveis efeitos parácrinos. células humanas de cordão umbilical foram incubadas durante 120 minutos a 37°C com veículo, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 25 µM ou 50 µM 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> (Ver Figura 8). Após a incubação, células Lin (-) CD34<sup>+</sup> foram isoladas, aRNA marcado foi preparado a partir de células e analisados os perfis de expressão do gene. Consistente com os resultados para células CD34<sup>+</sup> incubadas com diferentes concentrações de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>, células Lin (-)CD34<sup>+</sup> isoladas do 20 sangue do cordão humano reproduziram a assinatura de expressão do gene 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> em 10 µM, com 10 µM, dando a máxima assinatura e nenhuma melhoria significativa 25 observada com concentração maior.

30 A plataforma microfluidica qPCR também foi usada para medir as mudanças de expressão de uma assinatura de expressão do gene de do 16,16- dimetil PGE<sub>2</sub> (Ver tabela 3 para genes) em células humanas CD34<sup>+</sup> tratadas com concentrações diferentes de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> (veículo, 100nM, 1µM, 10µM, 50µM ou 100µM), a 37°C por 2 horas. Figura 16 mostra que a assinatura da expressão do gene 16,16 dimetil PGE<sub>2</sub> era máxima a 10 µM, mas que nenhuma mudança substancial adicional na assinatura da expressão do gene ocorreu acima de 10 µM de 16,16 dimetil PGE<sub>2</sub>.

35 Para os dados mostrados na figura 14, as reações da detecção da expressão do gene para o seguinte grupo dos genes falharam e foram excluídas desta análise: ADCY7, CCND1, CREB5, GULP1, MPPE1, PDE3B, PTGER2, RGS2, e YPEL4. Para os dados mos-

trados em figura 14, os seguintes genes controle housekeeping foram usados: ACTB, ARPC2, GAPDH, HPRT1, LRIG2, e QARS.

*Temperatura de Incubação*

Os perfis da expressão do gene foram analisados para células CD34<sup>+</sup> incubadas com o 16,16 dimetil PGE<sub>2</sub> a 4°C, 25°C, ou a 37°C (ver figuras 9 e 22). Estes resultados mostraram que as mudanças da expressão do gene associadas a assinatura da expressão do gene com 16,16 dimetil PGE<sub>2</sub> ocorreram na incubação a 37°C por 60-120 minutos, com alterações da expressão do gene mais robustas em 120 minutos. Além disso, a concentração e a temperatura foram covariadas, e determinou-se que temperaturas mais baixas e altas concentrações de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> não poderiam ser usadas para replicar os efeitos de uma temperatura mais elevada (dados não mostrados). Assim, o tratamento a 100 µM 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 4°C e 25°C rendeu mudanças de expressão de gene menores que a 10 µM 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 37 C.

Da mesma forma, os resultados mostraram que a expressão gênica em células CD34<sup>+</sup> isoladas ou células Lin (-)CD34<sup>+</sup> de sangue de cordão umbilical humano resultaram regulação para cima de genes envolvidos retorno e enxerto HSC, por exemplo, CXCR4; genes responsivos cAMP, por exemplo, CREM; e modulação da expressão do gene associado a vias de sinalização PGE<sub>2</sub>, adesão celular e sinalização por quimiocinas. Significativamente mais genes tiveram pelo menos um aumento de 2 vezes ou diminuição na expressão gênica (teste-t  $p < 0,05$  para cada gene/sonda) após incubação com 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 37°C comparado com incubação a 25°C ou 4°C. Em particular, houve alterações estatisticamente significativas na expressão gênica em genes associados com retorno de células tronco hematopoiéticas progenitoras, por exemplo, CXCR4 ( $p = 0.00014$ ), e de genes associados com aumentada PGE<sub>2</sub>R<sub>2</sub>/ via de sinalização de célula R4, por exemplo, CREM ( $p = 0,0012$ ), a 37°C comparado com incubação a 25°C ou 4°C.

Além disso, contrariamente às expectativas pré-clínicas, não foi observado nenhum aumento na expressão gênica de apoptose ou morte celular dos genes associados nas células incubadas a 37°C, que anteriormente foi pensado estar associado com a diminuição da viabilidade celular de CD34<sup>+</sup> e meia vida de 16,16-dimetil PGE 2.

30 EXEMPLO 3

ENSAIOS DE VIABILIDADE DE células

Células de sangue total de cordão ou células CD34<sup>+</sup> obtidas de Stem Cell Technologies (Vancouver, Canada) foram aliquotadas igualmente em tubos Eppendorf e tratadas ex vivo a uma faixa de concentrações (10 µM a 100 µM) de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> ou DMSO controle; temperaturas (4°C, 22°C, ou 37°C) durante 60 ou 120 minutos em meio LMD/5% de HSA. Após o tratamento, uma alíquota das células incubadas foi testada usando a coloração 7-amino-actinomicina D (7-AAD) como um indicador da morte celular. Um Milhão de sangue

total de cordão foram coradas com 5  $\mu$ L de solução de coloração 7AAD (BD Bioscience, San Jose, CA), ou 200.000 células CD34 $^{+}$  de sangue de cordão foram coradas com 1  $\mu$ L solução 7-AAD. As células foram analisadas em um sistema de Guava EasyCyte 8HT System (Millipore) e com o pacote de software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR). Uma alíquota separada das mesmas células também foi tomada para a avaliação do potencial de proliferação de utilizando ensaios de CFC-U (discutido abaixo no Exemplo 4).

Os resultados mostraram que sangue total de cordão ou células CD34 $^{+}$  incubadas com 16,16-dimetil PGE2, a temperaturas relativamente elevadas para longos períodos de incubação não diminuiu a viabilidade celular em comparação com células incubadas em outras condições, em contraste com o que era esperado a partir de experimentos pré-clínicos prévios. Assim, não houve diminuição estatisticamente significativa na avaliação por 7-AAD- de células vivas a partir de 4°C a 37°C (Ver Figuras 10 e 19B-C).

#### EXEMPLO 4

##### ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO DE células

Ensaios de Formação de Unidade de Colônias de células (CFU-C) foram realizadas utilizando um kit de ensaio de metil celulose, MethoCult® GF H4034 (Stem Cell Technologies, Vancouver, CA). Células de sangue total de cordão ou células CD34 $^{+}$  obtidas de Stem Cell Technologies (Vancouver, Canadá) foram aliquotadas igualmente em tubos Eppendorf e tratada ex vivo em uma faixa de concentrações de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> (10  $\mu$ M a 100  $\mu$ M) ou controle DMSO; temperaturas (4°C, 22°C, ou 37°C) durante 120 minutos, em LMD/media 5% de HSA. Após o tratamento, as células foram lavadas em LMD/5% de HSA e ressuspensas em meio de Iscove contendo Meios de 2% de soro fetal de bovino (FBS) (Stem Cell Technologies). As células foram então carregados para um tubo de ensaio MethoCult®, e, misturado plaqueadas em placas de cultura de 35 mm de tecido de acordo com as instruções do fabricante. A menos que mencionado de outra forma, o equivalente de 10.000 e 250 células WCB células CD34 $^{+}$  foram carregadas em cada placa.

Os resultados mostraram que as células de sangue total de cordão ou células CD34 $^{+}$  incubadas com 16,16-dimetil PGE2, a temperaturas elevadas durante períodos relativamente longos de incubação tinham um maior potencial proliferativo (por exemplo a, a capacidade de auto-renovação) do que as células incubadas em outras condições, em contraste com as expectativas baseadas em anteriores ensaios pré-clínicos. Assim, verificou-se um aumento estatisticamente significativo no potencial proliferativo celular a partir de 4°C a 37°C (ver Figura 11).

#### EXEMPLO 5

Expressão de CXCR4 na superfície celular de células tratadas com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>

##### Citometria de Fluxo

Células de Sangue de Cordão CD34<sup>+</sup> (Stem Cell Technologies ou All Cells) foram tratadas por 2 horas a 37°C com 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> ou DMSO como controle em LMD/5% de HSA. Após o tratamento, as células foram lavadas com LMD/5% de HSA e centrifugadas a 650 x g por 10 minutos. As células foram então classificadas para se isolar células de longa vida, vida curta e células progenitoras multipotentes de acordo com um protocolo publicado em outro local (Park et al., 2008) As células foram então ressuspensas em meio de coloração (mencionado acima), o anticorpo e a coloração foram adicionados. Todos os anticorpos eram da BD Biosciences, a menos que indicado de outra maneira. Painéis de anticorpos de depleção de linhagem incluíram CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD56, CD235 e foram todos diretamente conjugado com FITC. Outros anticorpos utilizados foram CD34 (8G12)-APC, CD38 PerCP Cy5.5, CD45RA-V450, e CD90-PE. As células foram coradas com a quantidade recomendada de anticorpos por 20 minutos em gelo e em seguida, lavadas duas vezes com meio de coloração. As células foram então ressuspensas a 2 milhões de células/ml e classificadas em um FACS Aria II utilizando software DiVa (BD Biosciences). As células foram recolhidas em meio StemSpan e mantidas a 4 ° C até a extração de ARN ser realizada.

Análise da expressão CXCR4 na superfície

Células de Sangue de Cordão CD34<sup>+</sup> foram tratadas com 10 µM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> ou DMSO em meio StemSpan por 2 Horas a 37°C ou por 1 hora a 4°C. Após o tratamento, as células foram lavadas em meio StemSpan, centrifugadas durante 10 minutos a 300 x g e ressuspensas em meios StemSpan contendo citocinas (por exemplo a, CC100) para promover a sobrevivência celular de CD34<sup>+</sup> e incubadas a 37°C durante 1, 6 e 24 horas. Depois de 1, 6 ou 24 horas de incubação, as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio de coloração Lineage cocktail, 1-FITC, CD34-APC, CXCR4 (CD184)-PE, e incubadas em gelo durante 15 minutos. Meios frescos de coloração foram então adicionados às células, e as células foram centrifugadas a 300 g durante 10 minutos, duas vezes. As células coradas foram adquiridos em a Guava EasyCyte 8HT e análise foi realizada utilizando Pacote Flojo de Software (Treestar).

Um aumento na expressão de RNA de CXCR4 de foi observado em todo sangue de cordão (WCB) ou células CD34<sup>+</sup> tratadas com 10 µM 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> durante 2 horas a 37°C, quando comparadas com as células tratadas com DMSO ou células tratadas com 10 µM durante 1 hora a 4°C. A expressão de CXCR4 na superfície celular é importante para o retorno para o nicho de medula óssea hematopoética das células tronco. Figura 18 mostra que a expressão da proteína CXCR4 de superfície aumenta na presença de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> sob certas condições. As células foram tratadas por 2 horas a 37°C por 1 hora com a 4°C ou com 10 uM de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> ou DMSO controle em meio StemSpan. A expressão de proteínas de superfície celular CXCR4 foi avaliada 1, 6 e 24 horas após o fim do tra-

tamento por citometria de fluxo.

- Uma hora após o tratamento, expressão de CXCR4 foi detectada em 48% das células CD34<sup>+</sup> de sangue de cordão tratadas com 10  $\mu$ M de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> em comparação com 3,5% de células tratadas com DMSO. Seis horas após o tratamento, 34,7% de células CD34<sup>+</sup> de sangue de cordão tratadas com 10  $\mu$ M 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> expressaram níveis detectáveis de CXCR4 em comparação com 1,7% de células tratadas com DMSO. Ao fim de 24 horas após o tratamento, o nível de CXCR4 presente em células CD34<sup>+</sup> de sangue de cordão tratada com 10  $\mu$ M 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> foi substancialmente o mesmo em comparação com as células tratadas com DMSO.
- Em contraste, as células CD34<sup>+</sup> de sangue de cordão tratadas com 10  $\mu$ M 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 4°C, não resultou em um aumento da expressão de CXCR4. Assim, a expressão do mRNA de CXCR4 nas células tratadas com 10  $\mu$ M 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> representa fielmente as proteínas de expressão CXCR4 na superfície celular nas células. Assim, em modalidades particulares clínicas, para obter a ativação máxima de HSC para efetuar a função HSC retorno, o tratamento de células com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 37°C é preferível em relação ao tratamento a 4°C.

#### EXEMPLO 6

##### ENSAIOS DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA NO BAÇO

- Os ensaios de Unidade formadora de colônias do baço no dia 12 (CFU-S12) foram realizados como descrito em North et al., *Nature*. 2007 Jun 21; 447 (7147):1007-11. Medula óssea inteira de camundongos doadores C57Bl/6 com 8 semanas de idade foi isolada e tratada com 10  $\mu$ M 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> ou DMSO a 4°C durante 1 hora a 37°C ou por 2 horas ou em PBS. Após o tratamento, as células foram lavadas por centrifugação e ressuspensas em PBS para injeção na veia da cauda, em camundongos C57BL/6 receptores (2 X 5/tratamento) que tinham sido previamente irradiados letalmente a 10,5 Gy. Foram injetadas 50,000 células por receptor.

- O aumento da assinatura de expressão de gene do 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> observada após tratamento com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 37°C por 2 horas comparado ao tratamento com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 4°C por 1 Hora foi posteriormente confirmado em um ensaio CFU-S.
- Medula óssea murina foi exposta ao tratamento com 10  $\mu$ M 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> ou DMSO por 1 ou 2 horas a 4°C ou 37°C e administrada a camundongos irradiados. Catorze dias mais tarde, os baços foram retirados e as colônias contadas. Os resultados mostraram que o tratamento a 4°C não provoca uma resposta cAMP ou um aumento no sinal de expressão de gene, mas resultou em um pequeno aumento no número de CFU-S em comparação com as células tratadas com DMSO. No entanto, este aumento é estatisticamente significativamente mais baixo do que quando as células foram incubadas com 10  $\mu$ M 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 37°C.

Células de Medula óssea murina inteira (WBM) foram expostas a 10  $\mu$ M 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> ou DMSO por 1 ou 2 horas, a 4°C ou 37°C. Um aumento estatisticamente significativo no número de CFU-S12 foi observado quando as células foram tratadas com 10  $\mu$ M 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>, independentemente da temperatura quando comparada com células tratadas com DMSO (Figura 19A). A exposição a 10  $\mu$ M 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 37°C, durante 2 horas, resultou na formação de 11,5  $\pm$  1,4, colônias o que foi significativamente maior do que WBM exposto a 10  $\mu$ M de tratamento com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 4°C durante 1 hora, 8,5  $\pm$  1,3 colônias ( $p <0,005$ ) ou para DMSO a 37°C por 2 horas, 4,0  $\pm$  0,8 colônias ( $p <0,001$ ). Além disso, WBM tratados com 10  $\mu$ M 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 37°C por 1 Hora (11,2  $\pm$  1,5) ou 2 horas (11,5  $\pm$  1,4) deram resultados semelhantes. O mesmo foi observado com tratamento de WBM com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> a 4°C, onde 1 ou 2 horas de exposição gerou resultados semelhantes, 8,5  $\pm$  1,3 e 8,4  $\pm$  1,0 colônias, respectivamente.

#### EXEMPLO 7

##### Quimiotaxia melhorada de células tratadas com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>

Os ensaios de quimiotaxia foram realizados utilizando câmaras de quimiotaxia de 96 poços, com membrana de policarbonato com tamanho de poros de 5mM (Corning Inc., Corning, NY), em conformidade com as instruções do fabricante. Resumidamente células de sangue de cordão humano CD34<sup>+</sup> (hCD34<sup>+</sup> CB) obtidas da All Cells foram descongeladas de acordo com as instruções do fabricante. As células foram então tratadas por 4 horas a 37°C com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> ou DMSO controle na concentração de 10  $\mu$ M de meio StemSpan (Stem Cell Technology, em Vancouver, Canadá). As células foram então lavadas por centrifugação (300 g durante 10 minutos) e ressuspensas em tampão de ensaio transwell (meio RPMI livre de Vermelho de Fenol (Mediatech), 0,5% de BSA livre de gordura (Sigma-Aldrich) em uma concentração de 40.000–60.000 células/75ul. Setenta e cinco  $\mu$ l de suspensão de células foram adicionados à câmara superior da placa, enquanto 235 $\mu$ l de meio de ensaio Transwell contendo 0 ou 50ng/mL SDF1 $\alpha$  (R&D System, Minneapolis, MN) foram adicionados ao poço do fundo. O número total de células na parte inferior do poço foi obtido por citometria de fluxo, utilizando 7AAD (BD Biosciences) para excluir as células mortas, após 4 horas de incubação a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Figura 20 mostra um fluxograma do ensaio funcional de quimiotaxia *in vitro* utilizado nestas experiências. A migração percentual foi calculada dividindo o número de células na parte inferior do poço pelo total de entrada de células, multiplicado por 100. As amostras foram analisadas em triplicata, foi calculada a média dos dados em seguida para a análise estatística.

Figura 21 mostra que o número de células CD34<sup>+</sup> migrando incubadas com 16,16-dimetil PGE aumentou significativamente quando expostas a 50ng/mL SDF1 $\alpha$  em comparação com o número de células CD34<sup>+</sup> migrando incubadas com controles negativos (DMSO ou 0ng/ml SDF1 $\alpha$ ). Assim, células CD34<sup>+</sup> tratadas com 16,16-dimetil PGE aumentaram as

propriedades de retorno de células tronco quando comparado com o DMSO ou células não-tratadas.

**EXEMPLO 8**

**ESTUDO CLÍNICO FASE 1B**

5        **Sumário**

Dados pré-clínicos gerados pelos presentes inventores suportou o uso de 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> como um promotor de retorno HSC, proliferação, diferenciação e sobrevivência. Com base nos dados pré-clínicos, um estudo clínico de Fase Ib foi iniciado em adultos com malignidades hematológicas submetidos a duplo (Sangue de cordão) transplante CB 10 depois de um regime de condicionamento de intensidade reduzida. Um objetivo primário deste estudo foi determinar a segurança de 16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub> tratado UCB baseado em enxerto no dia com 42 com > 5% de quimerismo do 16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub> unidade tratada UCB. Os objetivos secundários incluíram o tempo de pega, as taxas de toxicidade não hematológicas, a falência do enxerto, GVHD, aguda e crônica, recaída, a mortalidade relacionada com o tratamento (TRM), quimerismo fracionário, livre de recidiva e sobrevivência geral. A dinâmica do enxerto competitivo da dupla UCB transplante permite determinar se dmPGE<sub>2</sub> modificados HSCs são capazes de competir com HSCs não modulados.

**Métodos**

Os critérios para a seleção de Sangue de cordão constituído por um mínimo de 4/6 20 de compatibilidade HLA de cada unidade de sangue de cordão para o sujeito, bem como para a outra unidade de sangue de cordão. Os pacientes sem um doador irmão ou combinando não relacionado foram condicionados com fludarabina (30 mg/m<sup>2</sup>/dia IV Dia -8 a-3), o melfalano (100 mg/m<sup>2</sup>/dia Dia IV-2), e ATG de coelho (1 mg/kg/dia Dias -7, -5, -3 e -1). O regime de imunossupressão incluiu sirolimus (alvo 3-12 ng/mL) e tacrolimus (alvo 5-10 ng/mL). No dia 0, os pacientes receberam duas unidades de Sangue de Cordão umbilical (UCB): a primeira unidade UCB (UCB tratada com 16,16-dimetil-PGE2), foi descongelada em banho maria e lavou-se com uma solução de 5% de albumina de soro humano (HSA) e de baixo peso molecular (LMW) de dextrano. As células foram incubadas com 16,16-dimetil PGE2, durante 2 horas a 37°C. Após uma lavagem final para remover o 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> 30 residua, a UCB tratada com 16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub> foi administrada ao paciente através de infusão sem manipulação adicional das células. A segunda unidade de UCB não tratada foi descongelada, lavada e infundida 2-6 horas mais tarde, sem modulação ou manipulação das células.

**Resultados**

35        Um total de 12 sujeitos foi inscrito e recebeu unidades UCB tratadas com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> do qual 11 indivíduos foram avaliados. A idade média foi de 57,5 anos (variação 19-66) e 67% eram do sexo masculino. O diagnóstico incluiu: AML (5), MDS (4) e

NHL/CLL (3). Todas as UCB tratadas com 16,16-dimetil-PGE2- foram tratadas e infundidas no Dia 0. Os tamanhos medianos das UCB pré-criopreservadas foram UCB tratadas com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> 2.7x10<sup>7</sup> TNC/kg (faixa 2,0-5,1) e 1.3x10<sup>5</sup> CD34/kg (intervalo 0,3-6,3); UCB não tratada: 2,0x10<sup>7</sup> TNC/kg (faixa 1,8-5) e 1,1 x 10<sup>5</sup> CD34/kg (intervalo de 0,5-3,4)

5 com uma dose de célula média combinada de 4.7x10<sup>7</sup> TNC/kg (intervalo de 3,9-10,1) e 2,1 x10<sup>5</sup> células CD34/faixa kg (1,4-9,7).

Tratamento da UCB com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> não resultou em perda significativa de células, com uma taxa de recuperação de células viáveis de células CD34<sup>+</sup> 90%. Os eventos adversos atribuídos a UCB tratada com 16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub> incluiu 1 evento grau cinco relacionado à infusão em quatro sujeitos, que consistiram em calafrios, rubor, dor abdominal, ou tosse. Um outro sujeito com doença arterial coronariana experimentou elevação ST Grau 4 transitória com infusão e evidências de isquemia miocárdica por ensaio de troponina cardíaca.

O tempo médio para a recuperação dos neutrófilos (> 500 células/mL) foi de 17 dias (intervalo de 15-27 dias), o que compara favoravelmente com uma média de 21 dias para um grupo controle histórico de pacientes tratados de forma semelhante na mesma instituição (n = 53, p=0,025). Estes dados também são vantajosos quando comparados com um grupo anterior de 9 pacientes, que também receberam uma unidade de SCU sem tratamento em combinação com UCB tratada com 16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub> que foi preparada utilizando um regime de incubação alternativo: tratamento com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> durante 60 minutos em gelo (uma temperatura de 4°C). Esses pacientes tiveram um tempo médio para a recuperação dos neutrófilos de 22 dias.

O tempo médio para uma contagem de plaquetas não suportada de 20.000/µL foi de 42 dias (n = 9 avaliáveis). Não houve casos de falência do enxerto primário ou secundário. A UCB tratada com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> foi a fonte dominante de hematopoiese em 9 dos 11 pacientes avaliados, e do quimerismo médio total das UCB tratadas com 16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub> no dia 14 foi de 90%, com dominância a longo prazo de novo pela unidade UCB tratada com 16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub>. Em comparação, na experiência anterior de 9 pacientes que receberam UCB não tratada uma UCB tratada com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> preparada usando o regime de incubação 4°C/ 60minutos, a UCB tratada com 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> foi a fonte dominante de hematopoiese em apenas 2 dos 9 casos.

Até o momento, apenas dois casos de GvHD aguda grau 2 foram observados e não houve casos observados de GvHD crônica. Além disso, não há casos de doença linfoproliferativa EBV foram registrados. TRM foi de 9% (1 sujeito), e um paciente teve uma recaída; 9 sujeitos permanecem vivos sem recaída com um acompanhamento médio de 5,0 meses (intervalo 1,6-9,4).

#### Conclusões

Estes dados suportam a vantagem de uma nova abordagem *ex vivo* de modulação para melhorar enxerto em pacientes submetidos a transplante UCB. Além disso, os resultados destas experiências demonstraram claramente que o aumento da temperatura de incubação de 4°C a 37°C e o aumento do tempo de incubação de 60 minutos a 120 minutos resultou em um aumento acentuado na atividade biológica de células tratadas com 16,16-dimetil PGE2. Este trabalho é um exemplo importante de como o perfil molecular pode ter um impacto direto sobre a medicina clínica e demonstra que tratamentos curtos *ex vivo* com pequenas moléculas podem melhorar a terapia celular.

EXEMPLO 9

10 ANÁLISE DE *HEAD TO HEAD* DE ATIVIDADE DE REPOUPULAÇÃO DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGO TRATADA *EX VIVO* COM dmPGE<sub>2</sub> A 4°C VERSUS 37°C

A presente invenção demonstra os efeitos da dmPGE<sub>2</sub> na recuperação WBC, incluindo recuperação melhoradas de eritróides, neutrófilos e plaquetas em comparação com os controles, quando as células são pulsadas a 37°C. O presente estudo é uma comparação *head to head* de enxerto de células tratadas *ex vivo* com dmPGE<sub>2</sub> a 4°C versus 37°C. Células de medula óssea de camundongos cogênicos CD45, 1 e CD45.2 são tratadas *ex vivo* por 2 horas com 10 µM de 16,16-dmPGE<sub>2</sub> e co-transplantadas para camundongos receptores híbridos letalmente irradiados, CD45 1/CD45.2. Grupos de 10 camundongos híbridos receberam 100.000 células de medula óssea CD45.1 tratadas com 16,16-dmPGE<sub>2</sub> a 4°C e 100.000 células de medula tratadas CD45.2 com 16,16-dmPGE<sub>2</sub> a 37°C. Uma segunda coorte de 10 camundongos recebeu 100.000 células de medula CD45.2 tratadas com 16,16-dmPGE<sub>2</sub> a 4°C e 100.000 células de medula óssea CD45.1 tratadas com 16,16-dmPGE<sub>2</sub> a 37°C para compensar o viés de cepa. Os camundongos são sangrados 1, 2, 3 e 4 meses após o transplante e as células do sangue periférico CD45.1 e CD45.2 positivas determinadas. Ao fim de 4 meses, reconstituição da tri-linhagem é avaliada para determinar qualquer tendência de reconstituição da linhagem ou diferença. Os camundongos são sacrificados e quimerismo da medula realizada 4 meses após o transplante. Desvio de 50%/50% quimerismo reflete a alteração na capacidade de enxertamento resultante dos protocolos de tratamento. Um esboço do estudo gráfico é mostrado na Figura 24.

EXEMPLO 10

MÉTODOS

Isolamento de células totais tratadas de sangue do cordão Lin (-) CD34<sup>+</sup>

Células mononucleares do sangue do cordão inteiros foram obtidas a partir de Stem Cell Technologies (Vancouver, Canada). Após descongelamento, as células foram tratadas com 16,16-dimetil-PGE2, ou controles apropriados, por exemplo, DMSO, em meio LMD/5% de HSA

Após o tratamento, as células foram lavadas com meio LMD/5% de HSA, centrifugadas durante 10 minutos a 650 x g, à temperatura ambiente e ressuspensas em tampão de seleção frio (tampão fosfato salino (PBS) sem Ca<sup>+</sup> ou Mg<sup>+</sup>; EDTA 2 mM e 0,5 % de HSA). Seleção magnética foi realizada utilizando o kit de Lineage Depletion (Lin) (Miltenyi Biotec, 5 abrun, CA), seguido por kit de enriquecimento de CD34<sup>+</sup> (Miltenyi Biotec). Depleção e enriquecimento de linhagem de células CD34<sup>+</sup> foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, utilizando um separador QuadroMACS™. Durante este processo, as células foram mantidas a 4°C. Uma vez que as células Lin- CD34<sup>+</sup> foram isoladas a partir de sangue 10 total de cordão umbilical tratado, uma aliquota foi analisada por citometria de fluxo para avaliar a pureza. A pureza das células foi superior a 90%. A maioria das células foi utilizada para extração de RNA usando kit de Isolamento Pico Pure RNA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) para análise Affymetrix.

As várias modalidades descritas acima podem ser combinadas para fornecer modalidades adicionais. Todas as patentes dos EUA, publicações de pedidos de patentes, 15 pedidos de patentes dos EUA, patentes estrangeiras, pedidos de patentes estrangeiras e publicações não patentes referidas na presente especificação e/ou listados no Formulário de Pedidos, são aqui incorporados como referência, em sua totalidade. Aspectos das modalidades podem ser modificados, se necessário, para utilizar os conceitos das várias patentes, pedidos e publicações para fornecer ainda modalidades adicionais.

20 Estas e outras alterações podem ser feitas às modalidades, à luz da descrição acima detalhada. Em geral, nas reivindicações que se seguem, os termos usados não devem ser interpretados para limitar as reivindicações para as modalidades específicas reveladas na especificação e nas reivindicações, mas deve ser interpretada de modo a incluir todas as modalidades possíveis, juntamente com o escopo completo de equivalentes aos quais tais 25 reivindicações têm direito. Consequentemente, as reivindicações não estão limitadas pela divulgação.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição terapêutica **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende uma população de células que compreendem pelo menos um milhão de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras humanas, em que:

5 a) as células tronco hematopoiéticas ou progenitoras foram contatadas *ex vivo* em uma temperatura de cerca de 37 °C a cerca de 39 °C com um agente que aumenta a expressão do gene de CXCR4 nas células;

b) a expressão do gene de CXCR4 é aumentada nas células tronco hematopoiéticas ou progenitoras em pelo menos cerca de 2 vezes comparado à expressão de CXCR4

10 em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada; e

c) em que a composição terapêutica compreende uma suspensão farmaceuticamente aceitável e estéril de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras prontas para administração a um paciente,

em que as células tronco hematopoiéticas ou progenitoras foram opcionalmente

15 contatadas com o agente durante um tempo de:

a) pelo menos cerca de uma hora;

b) de cerca de uma hora a cerca de seis horas;

c) de cerca de duas horas a cerca de seis horas; ou

d) cerca de duas horas.

20 2. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 1 **CARACTERIZADA** pelo fato de que as células tronco hematopoiéticas ou progenitoras compreendem:

a) um aumento na expressão gênica de CXCR4 de pelo menos cerca de 3 vezes comparado à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada;

25 b) a expressão de um ou mais genes de assinatura é aumentada em pelo menos cerca de 2 vezes comparado à expressão do um ou mais genes de assinatura em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada, em que o gene de assinatura é selecionado do grupo que consiste em: hialuronan sintase 1 (HAS1), proteína GEM de ligação a GTP (GEM), proteína fosfatase 4 de especificidade dual (DUSP4), anfiregulina (AREG), proteína 1 relacionada a receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento responsável de cAMP (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), e antígeno 2 relacionado a Fos (FOSL2);

30 c) a expressão de pelo menos dois dos genes de assinatura selecionados do grupo que consiste em: hialuronan sintase 1 (HAS1), proteína GEM de ligação a GTP (GEM), proteína fosfatase 4 de especificidade dual (DUSP4), anfiregulina (AREG), proteína 1 relacionada a receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento responsável de cAMP (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), e antígeno 2 relacionado a Fos (FOSL2) é

aumentada em pelo menos 5, 10, 15 ou 20 vezes comparado à expressão dos dois genes de assinatura em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada; ou

5 d) a expressão de cada gene de assinatura selecionado do grupo que consiste em: hialuronan sintase 1 (HAS1), proteína GEM de ligação a GTP (GEM), proteína fosfatase 4 de especificidade dual (DUSP4), anfiregulina (AREG), proteína 1 relacionada a receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento responsivo de cAMP (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), e antígeno 2 relacionado a Fos (FOSL2) é aumentada em pelo menos cerca de 5, 10, 15 ou 20 vezes comparado à expressão dos genes de assinatura em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada.

10 3. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que:

15 a) a população de células compreende menos do que cerca de 0,10, 0,50, 1, 0, 3, 5, 10, 15, 20, ou 30% de células CD34<sup>+</sup>;

20 b) a população de células compreende pelo menos cerca de 0,01% e não mais do que cerca de 50% de células CD34<sup>+</sup>;

c) a população de células não é expandida *ex vivo*;

25 d) a população de células compreende menos do que cerca de 30%, 25%, 20%, 15%, 10% ou 5% de células tronco mesenquimais;

30 e) a população de células compreende menos do que cerca de 30%, 25%, 20%, 15%, 10% ou 5% de células progenitoras endoteliais;

f) a população de células é obtida de medula óssea, sangue de cordão umbilical, ou sangue periférico mobilizado;

35 g) a população de células é HLA haplotipado;

30 h) a população de células é HLA haplotipado baseado no grupo que consiste em HLA-A, HLA-B, HLA-C e HLA-DRB1;

i) a população de células é HLA haplotipado e combinado com um indivíduo humano específico; ou

35 j) a população de células é HLA haplotipado e possui 4 de 6 combinações de HLA com um indivíduo humano específico.

4. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição terapêutica é substancialmente isenta do agente.

5. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos cerca de 15% de células dentro da população de células expressa proteína CXCR4.

35 6. Composição terapêutica **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende uma população de células compreendendo pelo menos cerca de um milhão de células tronco hematopoiéticas humanas ou progenitoras, em que:

- a) as células tronco hematopoiéticas ou progenitoras foram contatadas *ex vivo* em uma temperatura de cerca de 37 °C a cerca de 39 °C com 16,16-dmPGE<sub>2</sub> por um tempo de cerca de duas horas;
- b) as células tronco hematopoiéticas ou progenitoras compreendem uma coleção de células CD34<sup>+</sup>, em que expressão gênica de CXCR4 é aumentada na coleção de células CD34<sup>+</sup> em pelo menos cerca de 3 vezes comparado à expressão de CXCR4 em células CD34<sup>+</sup> não contatadas; e
- c) em que a composição terapêutica compreende uma suspensão estéril farmaceuticamente aceitável de células tronco hematopoiéticas ou progenitoras prontas para administração a um paciente,
- em que as células tronco hematopoiéticas ou progenitoras opcionalmente compreendem:
- a) uma assinatura de expressão de gene, em que a expressão de um ou mais genes de assinatura é aumentada em pelo menos cerca de 2 vezes comparado à expressão dos um ou mais genes de assinatura em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada, em que o gene de assinatura é selecionado do grupo que consiste em: hialuronan sintase 1 (HAS1), proteína GEM de ligação a GTP (GEM), proteína fosfatase 4 de especificidade dual (DUSP4), anfiregulina (AREG), proteína 1 relacionada a receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento responsivo de cAMP (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), e antígeno 2 relacionado a Fos (FOSL2);
- b) a expressão de pelo menos dois dos genes de assinatura é aumentada em pelo menos 5, 10, 15, ou 20 vezes comparado à expressão dos dois genes de assinatura em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada;
- c) a expressão de cada um dos genes de assinatura é aumentada em pelo menos cerca de 2 vezes comparado à expressão dos genes de assinatura em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada,
- ou em que:
- a) a população de células compreende opcionalmente menos do que cerca de 0,10, 0,50, 1,0, 3, 5, 10, 15, 20 ou 30% de células CD34<sup>+</sup>;
- b) a população de células compreende opcionalmente pelo menos cerca de 0,01% e não mais do que cerca de 50% de células CD34<sup>+</sup>;
- c) a população de células opcionalmente não é expandida *ex vivo*;
- d) a população de células é opcionalmente obtida de medula óssea, sangue de cordão umbilical, ou sangue periférico mobilizado;
- e) a população de células é opcionalmente HLA haplotipado;
- f) a população de células é opcionalmente HLA haplotipado baseado no grupo que consiste em HLA-A, HLA-B, HLA-C e HLA-DRB1;

g) a população de células é opcionalmente HLA haplotipado e combinado com um indivíduo humano específico; ou

h) a população de células é opcionalmente HLA haplotipado e possui 4 de 6 combinações de HLA com um indivíduo humano específico.

5 7. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a população de células é uma população de células haplotipadas compreendendo pelo menos cerca de um milhão de células tronco hematopoiéticas humanas ou progenitoras, em que preferivelmente:

10 a) a população de células haplotipadas é haplotipada baseada no grupo que consiste em HLA-A, HLA-B, HLA-C, e HLA-DRB1;

b) a população de células haplotipadas é haplotipada baseada no grupo que consiste em HLA-DRB3/4/5, HLA-DQB1, e DPB1;

c) a população de células haplotipadas é combinada com um indivíduo humano específico;

15 d) a população de células HLA haplotipado tem 4 de 6 combinações de HLA com um indivíduo humano específico, ou

em que as células tronco hematopoiéticas humanas ou progenitoras compreendem, preferivelmente:

20 a) um aumento na expressão gênica de CXCR4 de pelo menos cerca de 3 vezes comparado à expressão de CXCR4 em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada;

25 b) uma assinatura de expressão gênica, em que a expressão de um ou mais genes de assinatura é aumentada em pelo menos cerca de 2 vezes comparado à expressão do um ou mais genes de assinatura em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada, em que o gene de assinatura é selecionado do grupo que consiste em: hialuronan sintase 1 (HAS1), proteína GEM de ligação a GTP (GEM), proteína fosfatase 4 de especificidade dual (DUSP4), anfiregulina (AREG), proteína 1 relacionada a receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento responsável de cAMP (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), e antígeno 2 relacionado a Fos (FOSL2);

30 c) a expressão de pelo menos dois dos genes de assinatura selecionados do grupo que consiste em: hialuronan sintase 1 (HAS1), proteína GEM de ligação a GTP (GEM), proteína fosfatase 4 de especificidade dual (DUSP4), anfiregulina (AREG), proteína 1 relacionada a receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento responsável de cAMP (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), e antígeno 2 relacionado a Fos (FOSL2) é aumentada em pelo menos 5, 10, 15 ou 20 vezes comparado à expressão dos dois genes de assinatura em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada; ou

35 d) a expressão de cada gene de assinatura selecionado do grupo que consiste em:

hialuronan sintase 1 (HAS1), proteína GEM de ligação a GTP (GEM), proteína fosfatase 4 de especificidade dual (DUSP4), anfiregulina (AREG), proteína 1 relacionada a receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento responsivo de cAMP (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), e antígeno 2 relacionado a Fos (FOSL2) é aumentada em pelo

5 menos cerca de 2 vezes comparado à expressão dos genes de assinatura em uma célula tronco hematopoiética ou progenitora não contatada.

8. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o agente que aumenta a expressão do gene de CXCR4 nas células tronco hematopoiéticas ou progenitoras é:

- 10 a) um análogo de cAMP ou melhorador, um ativador Ga-s, ou um composto que seletivamente liga o receptor PGE<sub>2</sub> EP<sub>4</sub>;
- b) PGE<sub>2</sub> ou um análogo ou derivado de PGE<sub>2</sub>; ou
- c) 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>.

9. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADA** pelo fato de que:

- a) a população de células compreende menos do que cerca de 0,10, 0,50, 1,0, 3, 5, 10, 15, 20, ou 30% de células CD34<sup>+</sup>;
- b) a população de células compreende pelo menos cerca de 0,01% e não mais do que cerca de 50% de Células CD34<sup>+</sup>,
- 20 c) a população de células não é expandida *ex vivo*; ou
- d) a população de células é obtida de medula óssea, sangue de cordão umbilical, ou sangue periférico mobilizado.

10. Método para preparar composição terapêutica **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende: contatar uma população de células compreendendo células tronco hematopoiéticas ou progenitoras *ex vivo* com um ou mais agentes em uma temperatura de cerca de 37 °C a cerca de 39°C em condições suficientes para modificar a expressão gênica das células tronco hematopoiéticas ou progenitoras para resultar em células tronco hematopoiéticas ou progenitoras compreendendo uma assinatura de expressão gênica compreendendo expressão aumentada, comparado a células tronco hematopoiéticas ou progenitoras não contatadas de um ou mais dos seguintes genes: hialuronan sintase 1 (HAS1), proteína GEM de ligação a GTP (GEM), proteína fosfatase 4 de especificidade dual (DUSP4), anfiregulina (AREG), proteína 1 relacionada a receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento responsivo de cAMP (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), antígeno 2 relacionado a Fos (FOSL2), ou receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4),

35 em que a população de células é preferivelmente obtida de medula óssea, sangue de cordão umbilical, ou sangue periférico mobilizado, ou  
em que pelo menos um dos um ou mais agentes é preferivelmente selecionado do

grupo que consiste em um melhorador cAMP, um ativador G $\alpha$ -s, um agente que seletivamente liga o receptor PGE<sub>2</sub>EP<sub>4</sub> ou compreende PGE<sub>2</sub> ou um análogo do mesmo.

11. População de células compreendendo células tronco hematopoiéticas e progenitoras **CARACTERIZADA** pelo fato de ser para uso em um método de aumento do enxerto

5 de células tronco hematopoiéticas e progenitoras em um indivíduo, o uso compreendendo:

a) contatar a população de células *ex vivo* em uma temperatura de cerca de 35 °C a cerca de 39 °C com um ou mais agentes selecionados do grupo que consiste em: prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e um agente tendo atividade de dmPG<sub>2</sub>;

b) lavar a população de células para remover substancialmente o agente; e

10 c) administrar a população de células a um indivíduo;

em que a população de células é contatada com o agente sob condições suficientes para aumentar o enxerto das células tronco hematopoiéticas ou progenitoras contatadas no indivíduo em comparação com células tronco hematopoiéticas ou progenitoras não contatadas,

15 em que a população de células é preferivelmente obtida de medula óssea, sangue de cordão umbilical ou sangue periférico mobilizado, ou

em que o agente é opcionalmente um análogo de PGE<sub>2</sub>,

em que o análogo de PGE<sub>2</sub> é preferivelmente 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>.

12. População de células compreendendo células tronco hematopoiéticas e progenitoras **CARACTERIZADA** pelo fato de ser para uso em um método de tratamento de um

20 indivíduo em necessidade de reconstituição do sistema hematopoiético, o uso compreendendo:

a) selecionar um indivíduo em necessidade de reconstituição do sistema hematopoiético;

25 b) contatar a população de células *ex vivo* em uma temperatura de cerca de 35 °C a cerca de 39 °C com um ou mais agentes selecionados do grupo que consiste em: prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e um agente tendo atividade de dmPG<sub>2</sub>;

c) lavar a população de células para remover substancialmente o agente; e

d) administrar a população de células ao indivíduo;

30 em que a população de células é contatada com o agente sob condições suficientes para aumentar o enxerto das células tronco hematopoiéticas e progenitoras contatadas no indivíduo em comparação com células tronco hematopoiéticas e progenitoras não contatadas, desse modo tratando o indivíduo em necessidade de reconstituição do sistema hematopoiético,

35 em que a população de células é preferivelmente obtida de medula óssea, sangue de cordão umbilical ou sangue periférico mobilizado, ou

em que o agente é preferivelmente PGE<sub>2</sub> ou um análogo do mesmo,

em que o análogo de PGE<sub>2</sub> é opcionalmente 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o indivíduo possui leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide crônica (CML), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia mielomonocítica juvenil, linfoma de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, mieloma múltiplo, anemia aplástica grave, 5 Anemia de Fanconi, hemoglobinuria noturna paroxismal (PNH), aplasia pura de células vermelhas, amegacariocitose/trombocitopenia congênita, síndrome de imunodeficiência combinada grave (SCID), síndrome de Wiskott-Aldrich, talassemia beta maior, doença de célula pilosa, síndrome de Hurler, adrenoleucodistrofia, leucodistrofia metacromática, mielodisplasia, 10 anemia refratária, leucemia mielomonocítica crônica, metaplasia mieloide agnogênica, linfohistiocitose eritrofagocítica familiar ou tumores sólidos,

em que o indivíduo possui opcionalmente câncer de mama, câncer ovariano, câncer cerebral, câncer de próstata, câncer pulmonar, câncer de colón, câncer de pele, câncer hepático, câncer pancreático, ou sarcoma,

15 em que o indivíduo opcionalmente recebeu radioterapia ou quimioterapia não-mieolablativa ou ablativa de medula óssea, ou

em que o indivíduo é opcionalmente um doador de medula óssea.

14. Método *ex vivo* para preparar uma população de células para aumentar a expansão de células tronco hematopoiéticas e progenitoras *in vivo* **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender: contatar uma população de células compreendendo células tronco hematopoiéticas e progenitoras *ex vivo* em uma temperatura de cerca de 35 °C a cerca de 20 39 °C, com um ou mais agentes selecionados do grupo que consiste em: uma prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e um agente tendo atividade de dmPGE<sub>2</sub>; em que a população de células é contatada com o agente sob condições suficientes para aumentar a expansão das células 25 tronco hematopoiéticas e progenitoras contatadas *in vivo* em comparação com as células tronco hematopoiéticas e progenitoras não contatadas,

em que a população de células é preferivelmente obtida de medula óssea, sangue de cordão umbilical, ou sangue periférico mobilizado, ou

em que o agente é preferivelmente PGE<sub>2</sub> ou um análogo do mesmo,

30 em que o análogo de PGE<sub>2</sub> é opcionalmente 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub>, ou

em que o agente é um melhorador cAMP.

15. População de células compreendendo células tronco hematopoiéticas e progenitoras **CARACTERIZADA** pelo fato de ser para uso em um método para aumentar a expansão de células tronco hematopoiéticas e progenitoras em um indivíduo, o uso compreendendo:

(a) contatar a população de células *ex vivo*, em uma temperatura de cerca de 37 °C, com um ou mais agentes selecionados do grupo que consiste em: uma prostaglandina E<sub>2</sub>

(PGE<sub>2</sub>) ou um agente tendo atividade de dmPGE<sub>2</sub>; e

(b) administrar a população de células a um indivíduo;

em que a população de células é contatada com o agente em condições suficientes para aumentar a expansão das células tronco hematopoiéticas e progenitoras contatadas no

5 indivíduo *in vivo* comparado às células tronco hematopoiéticas e progenitoras não contatadas.

em que o indivíduo possui leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide crônica (CML), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia

10 mielomonocítica juvenil, linfoma de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, mieloma múltiplo, anemia aplástica grave, anemia de Fanconi, hemoglobinuria noturna paroxismal (PNH), aplasia pura de células vermelhas, amegacariocitose/trombocitopenia congênita, síndrome de imunodeficiência combinada grave (SCID), síndrome de Wiskott-Aldrich, talassemia beta maior, doença de célula pilosa, síndrome de Hurler, adrenoleucodistrofia, leucodistrofia metacromática, mielodisplasia, anemia refratária, leucemia mielomonocítica crônica, metaplasia mieloide

15 agnogênica, linfohistiocitose eritrofagocítica familiar ou tumores sólidos,

em que o indivíduo possui preferivelmente câncer de mama, câncer ovariano, câncer cerebral, câncer de próstata, câncer pulmonar, câncer de cólon, câncer de pele, câncer hepático, câncer pancreático, ou sarcoma, ou

20 em que o indivíduo preferivelmente recebeu radioterapia ou quimioterapia não-mieolablativa ou ablativa de medula óssea, ou

em que o indivíduo é preferivelmente um doador de medula óssea.

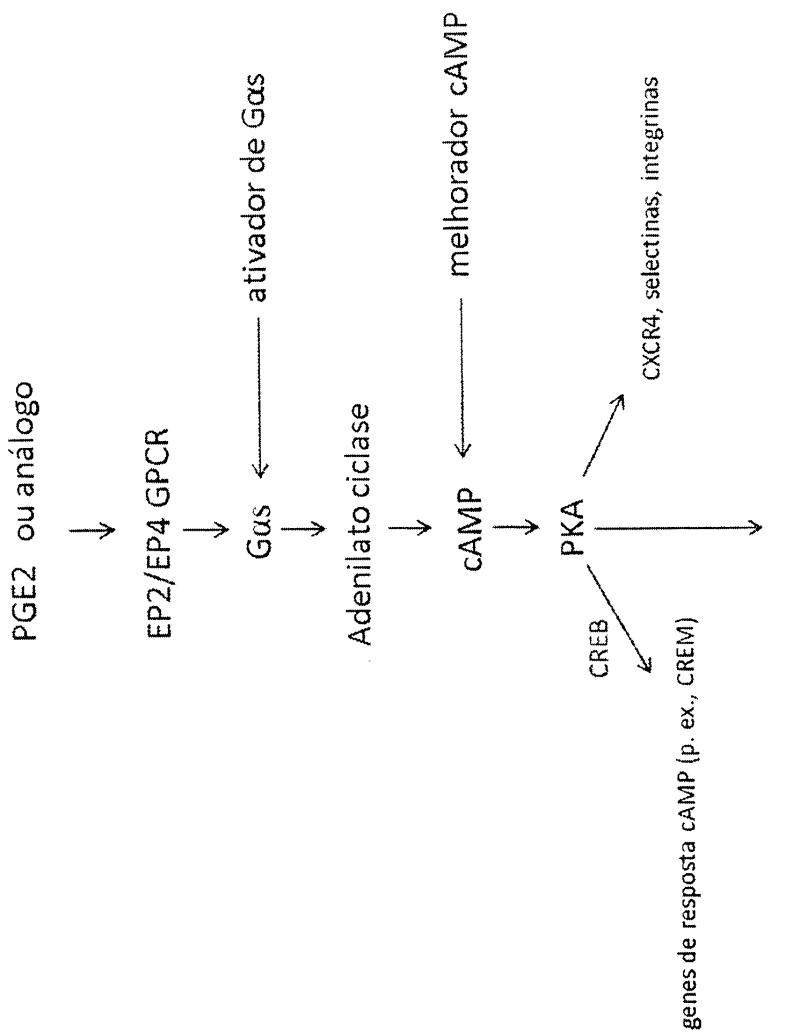


FIG. 1

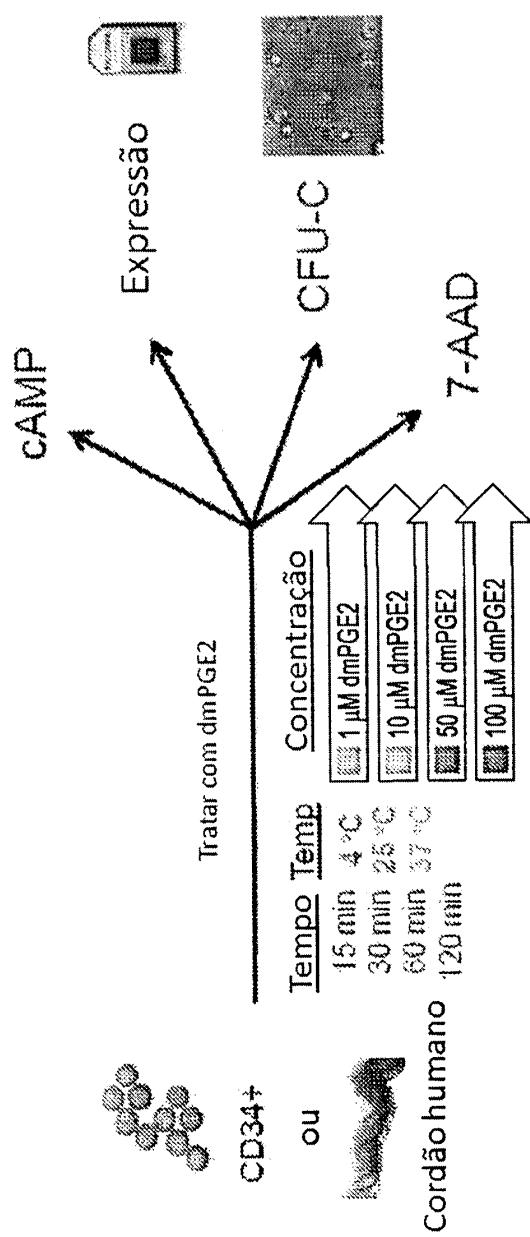


FIG. 2

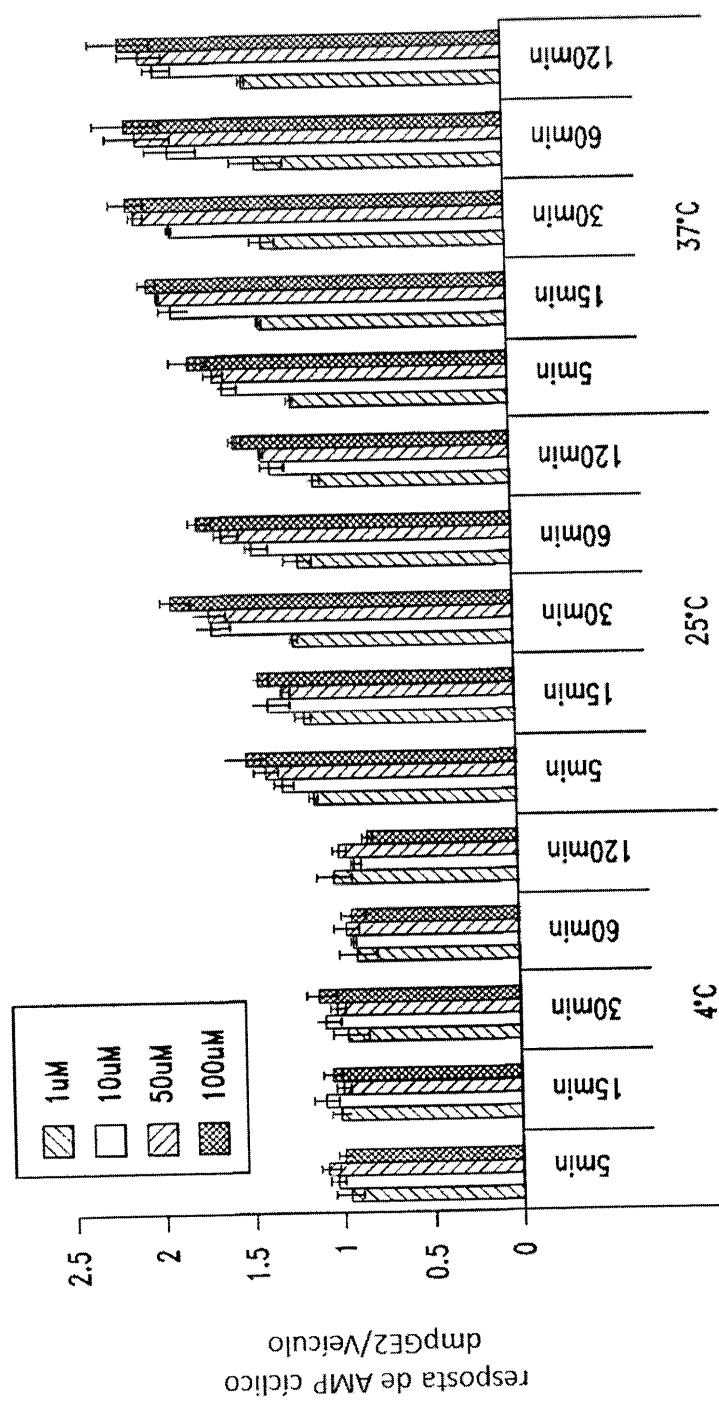


FIG. 3

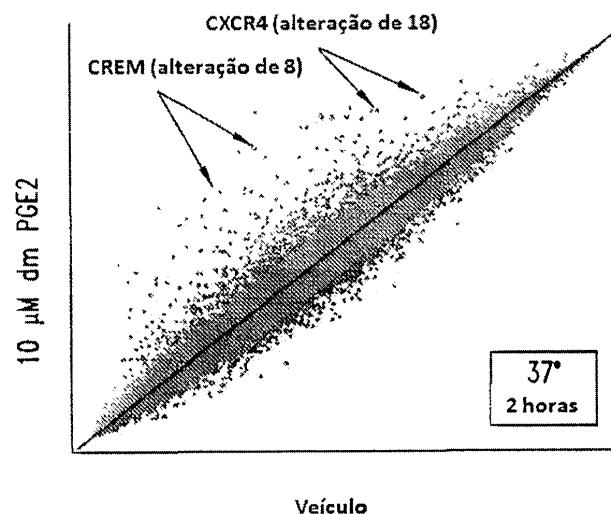


FIG. 4

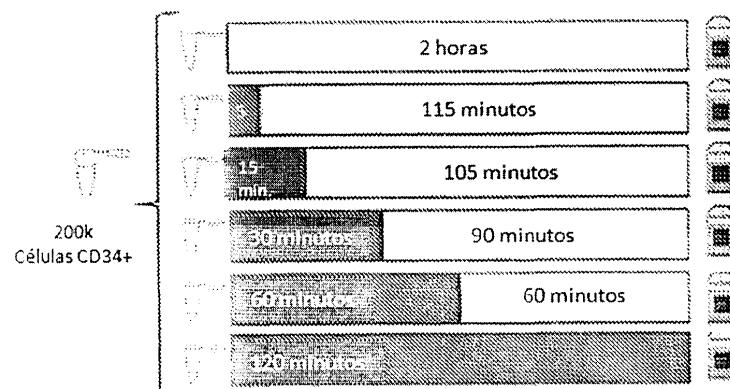


FIG. 5

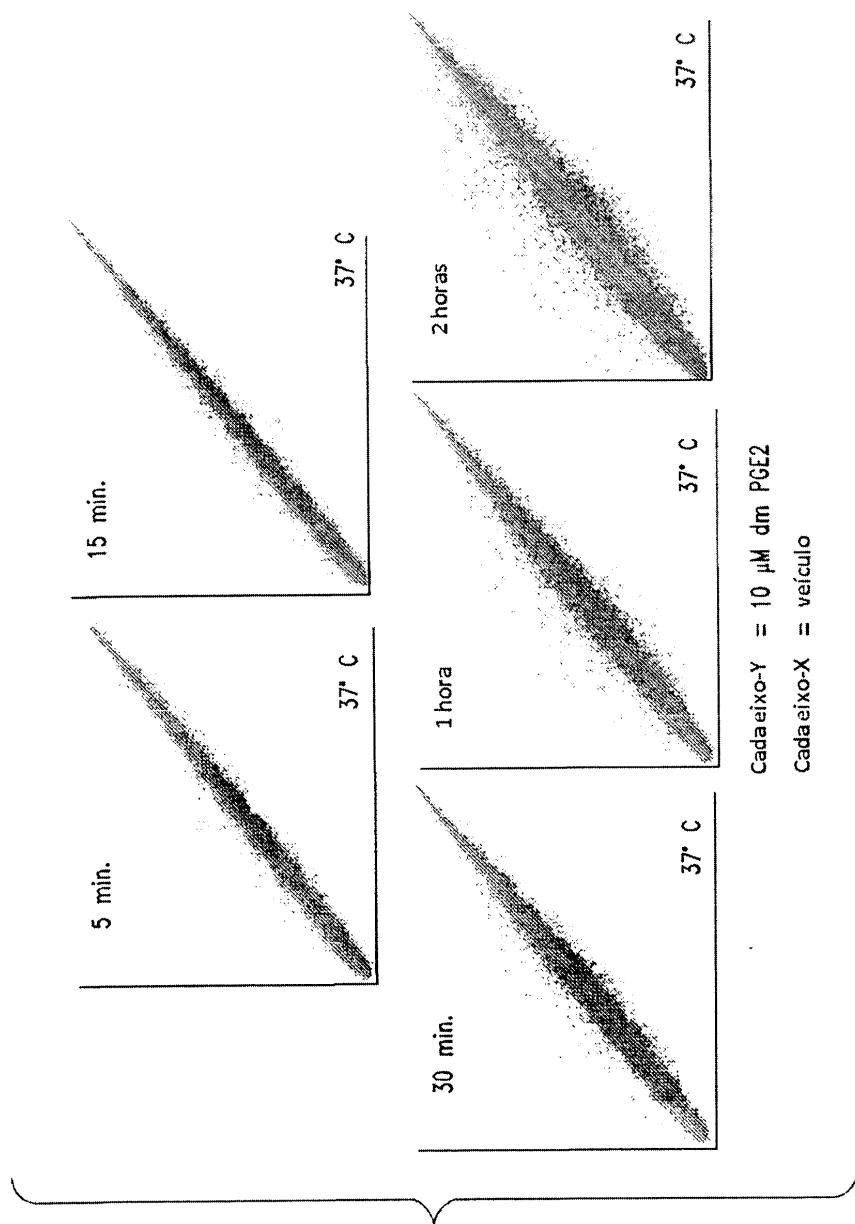


FIG. 6

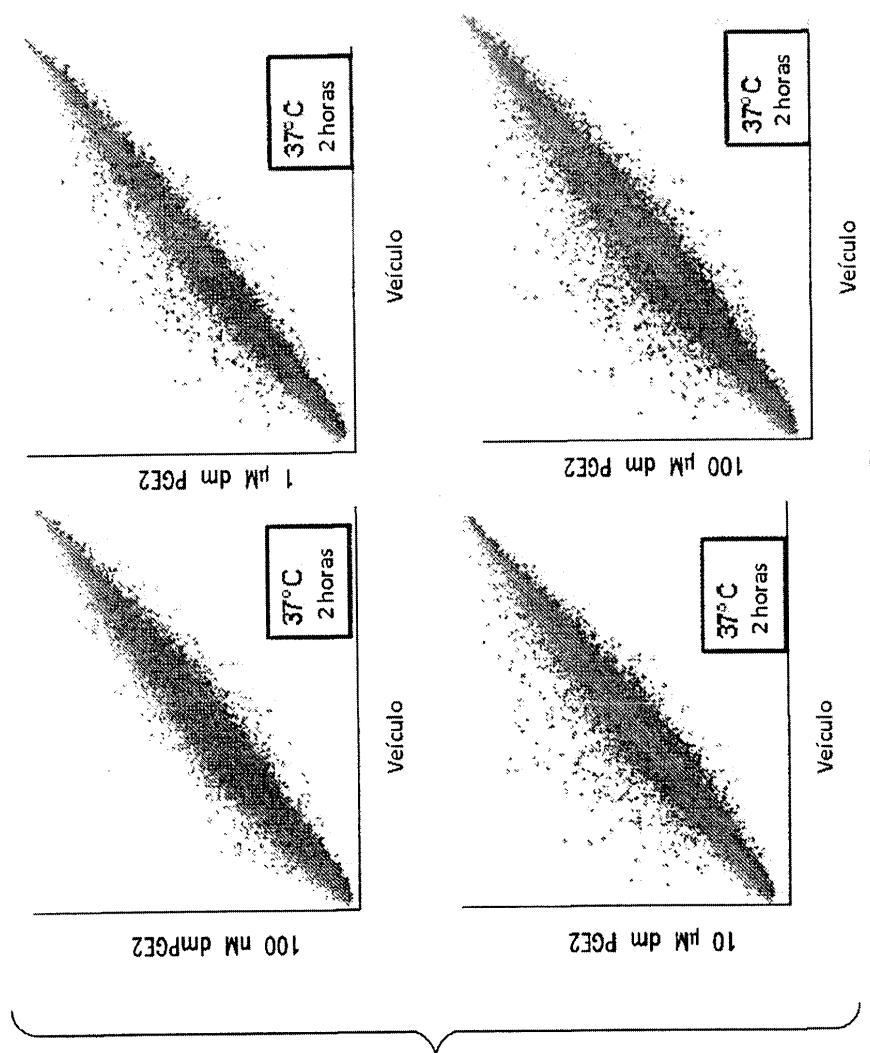
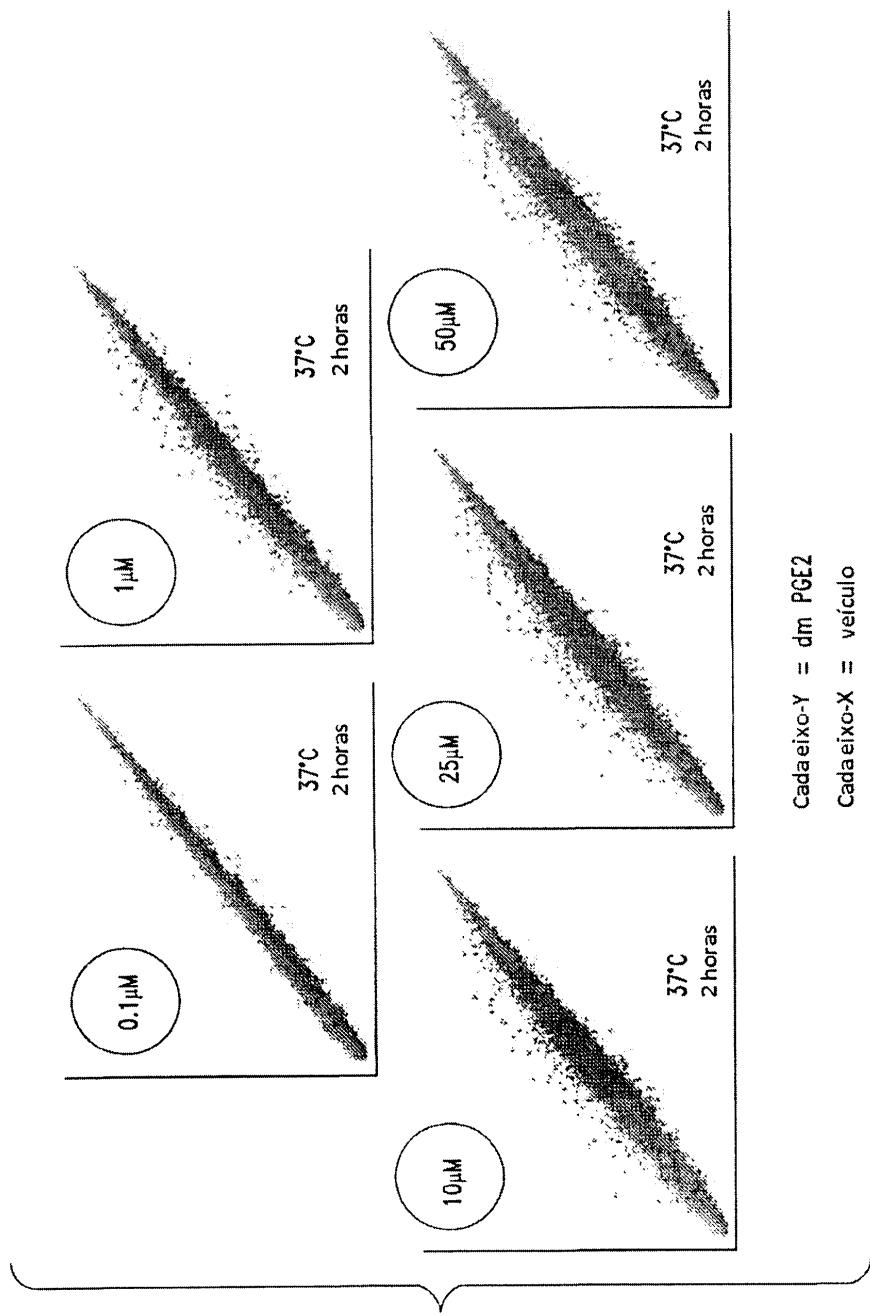


FIG. 7



Cada eixo-Y = dm PGE2  
Cada eixo-X = veículo

FIG. 8

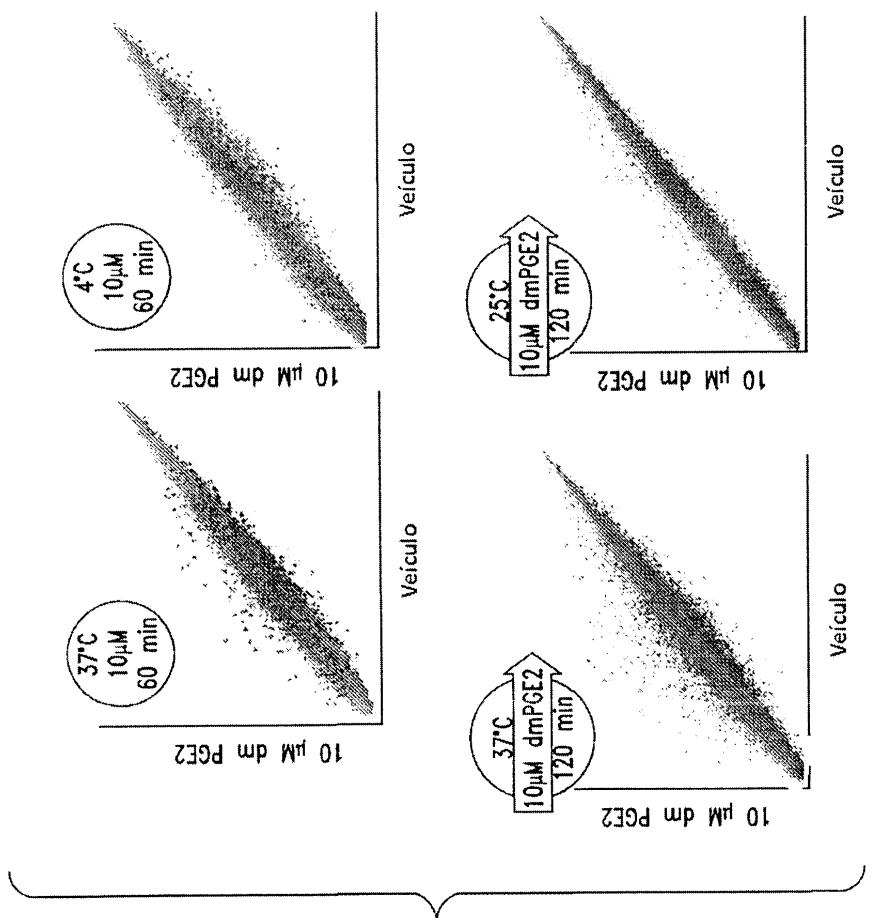


FIG. 9

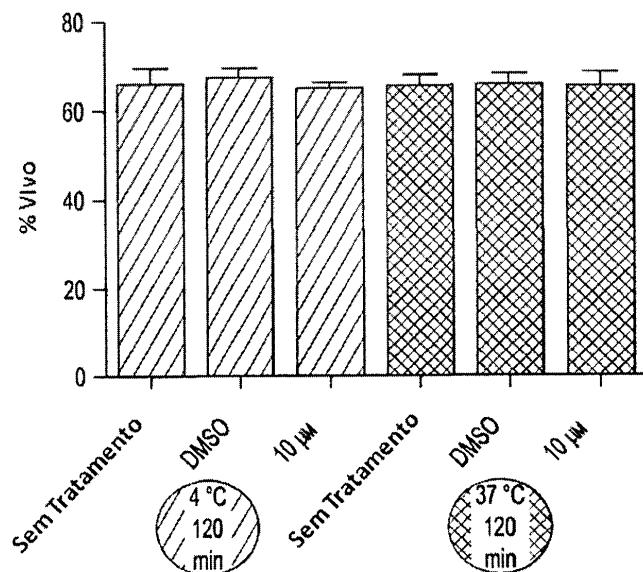


FIG. 10

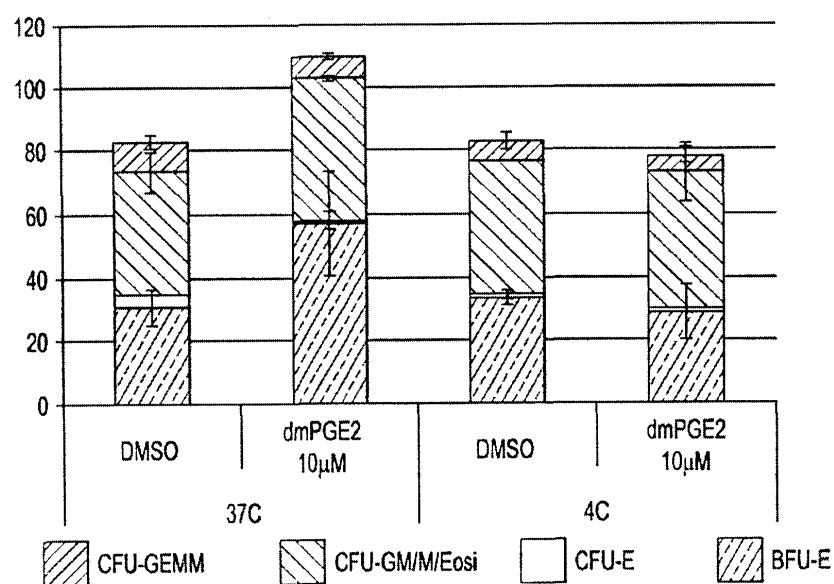


FIG. 11

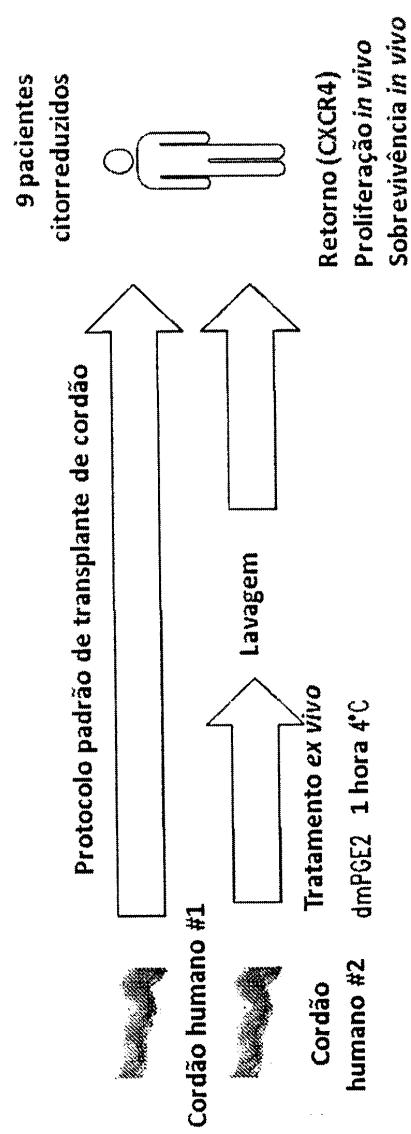


FIG. 12

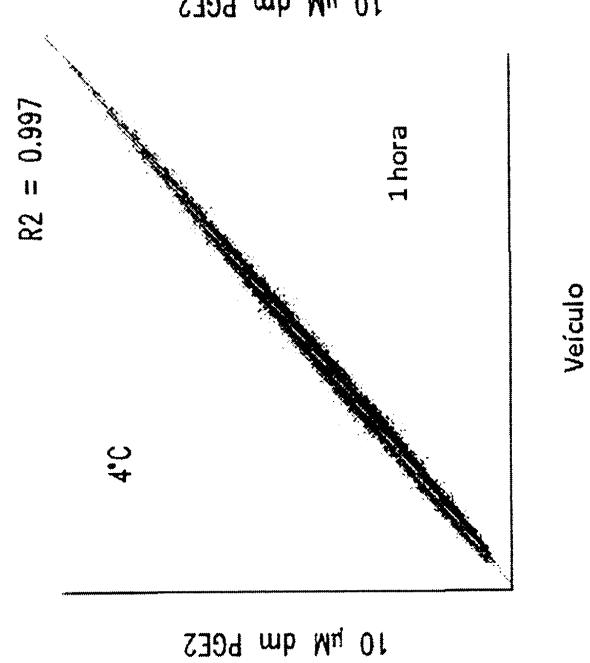
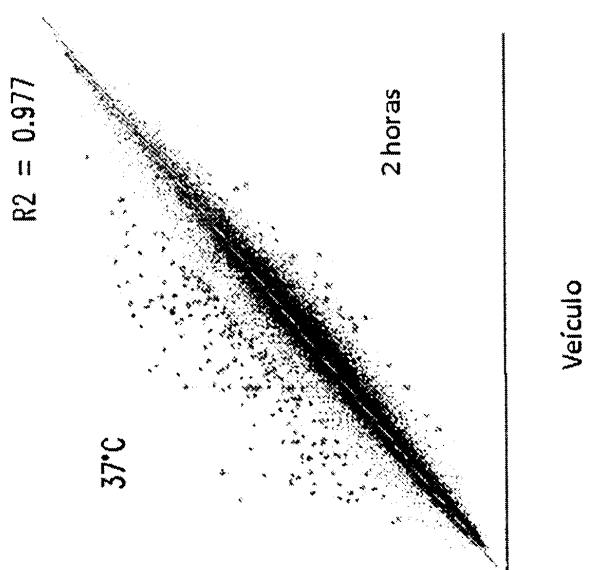


FIG. 13B

FIG. 13A

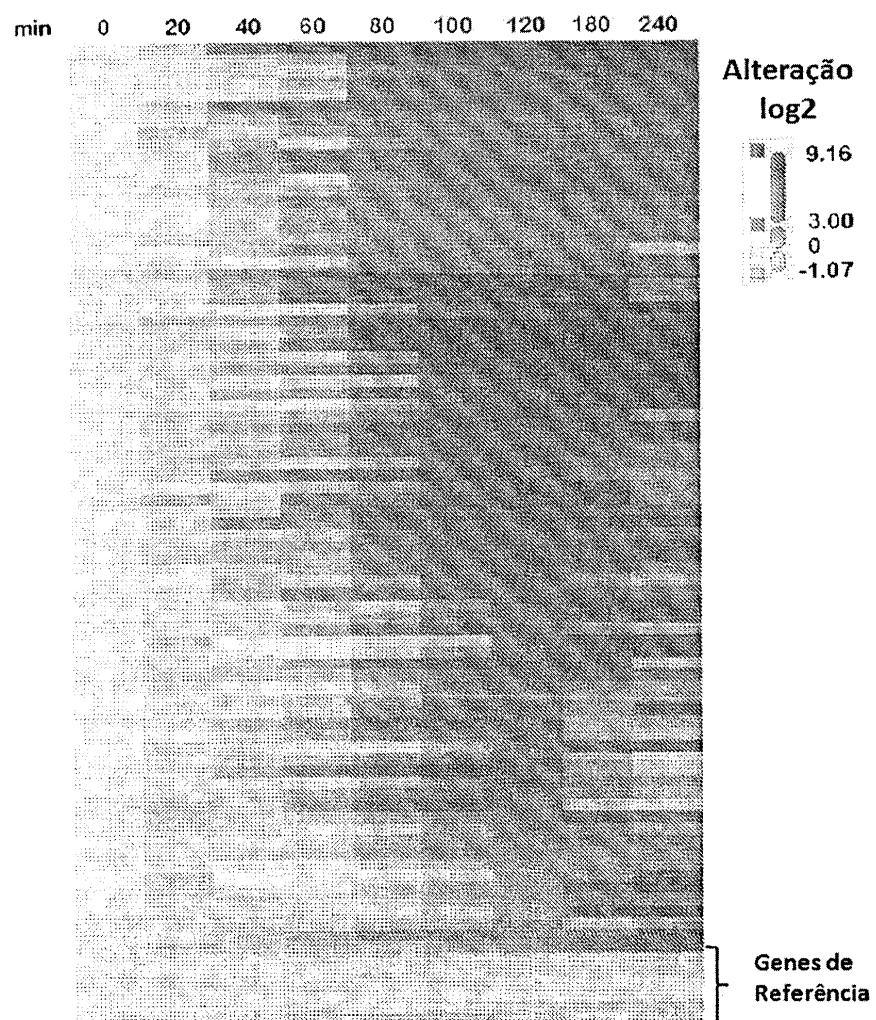
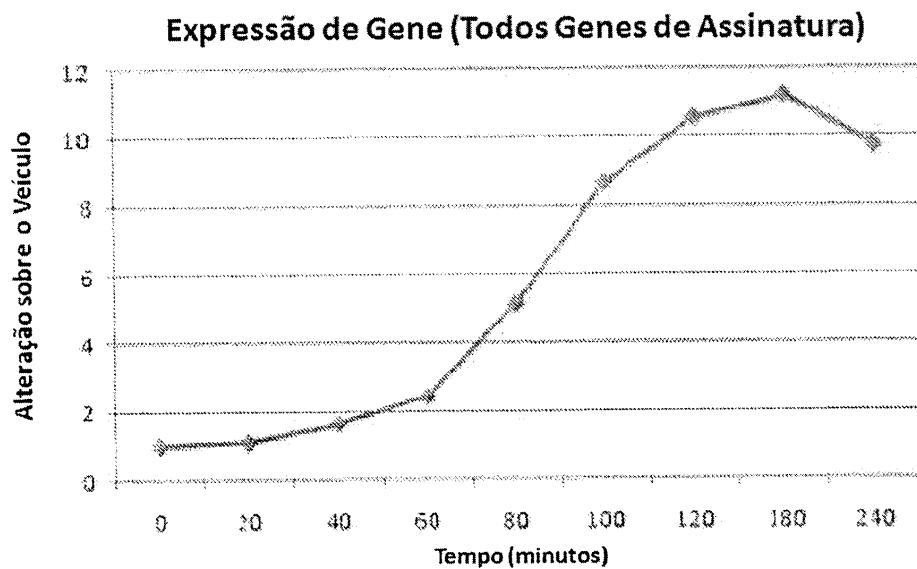
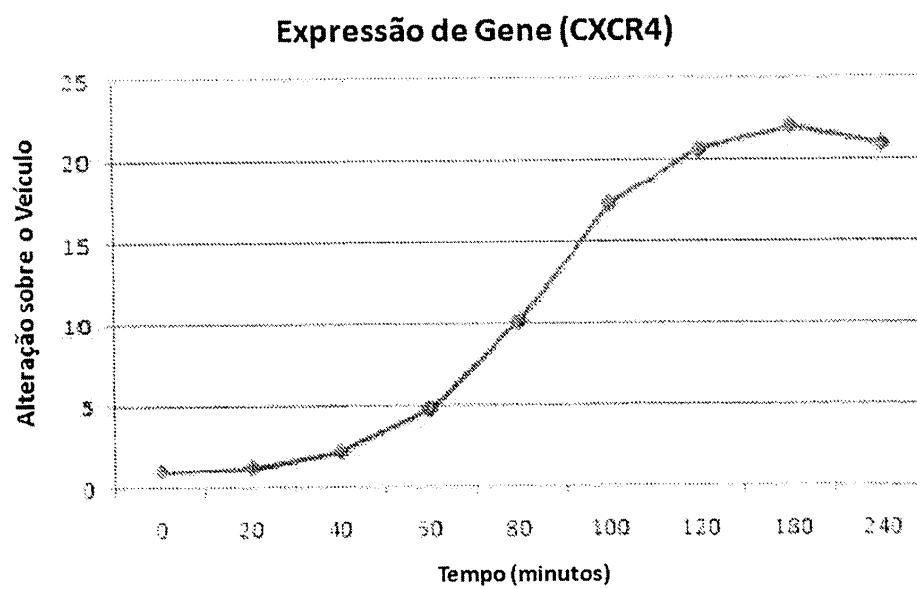


FIG. 14A



*FIG. 14B*



*FIG. 14C*

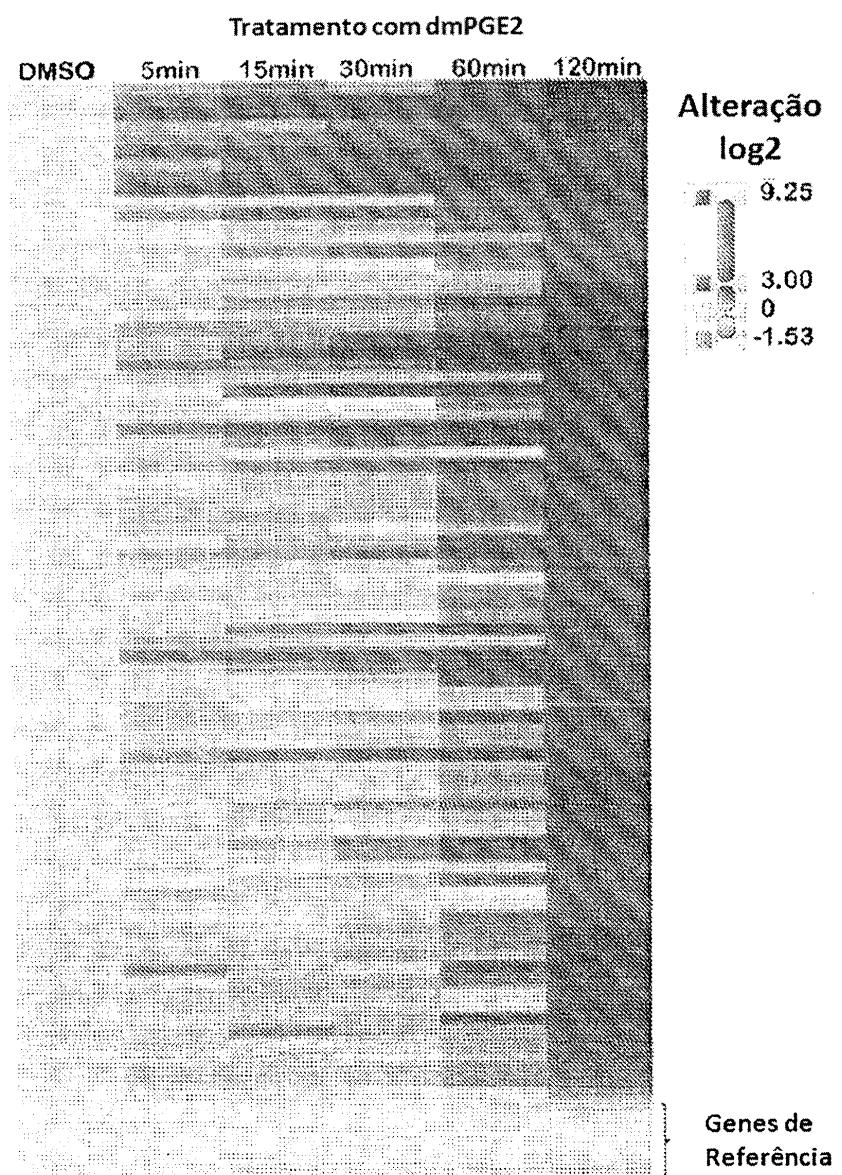


FIG. 15A

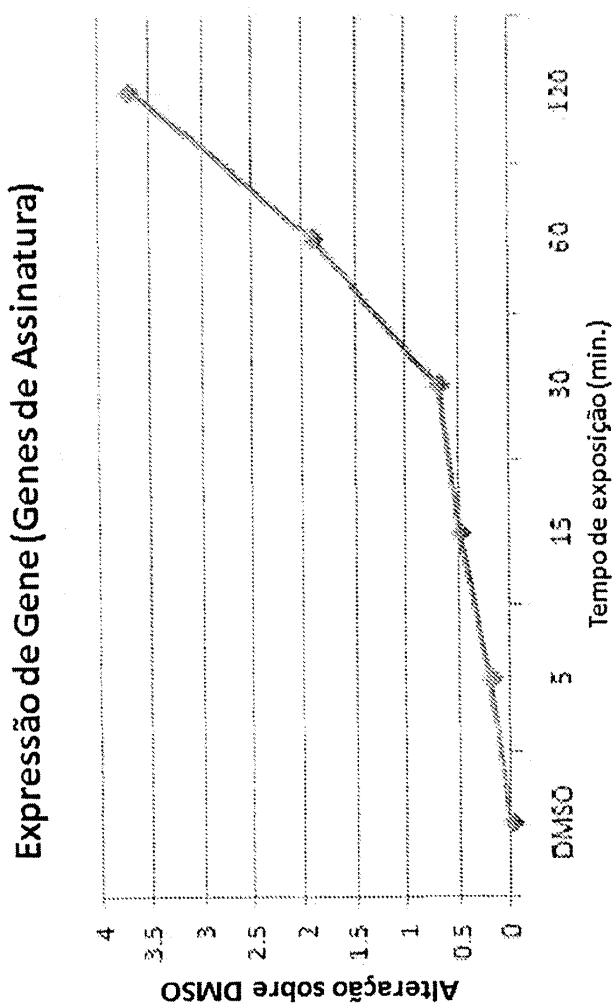


FIG. 15B

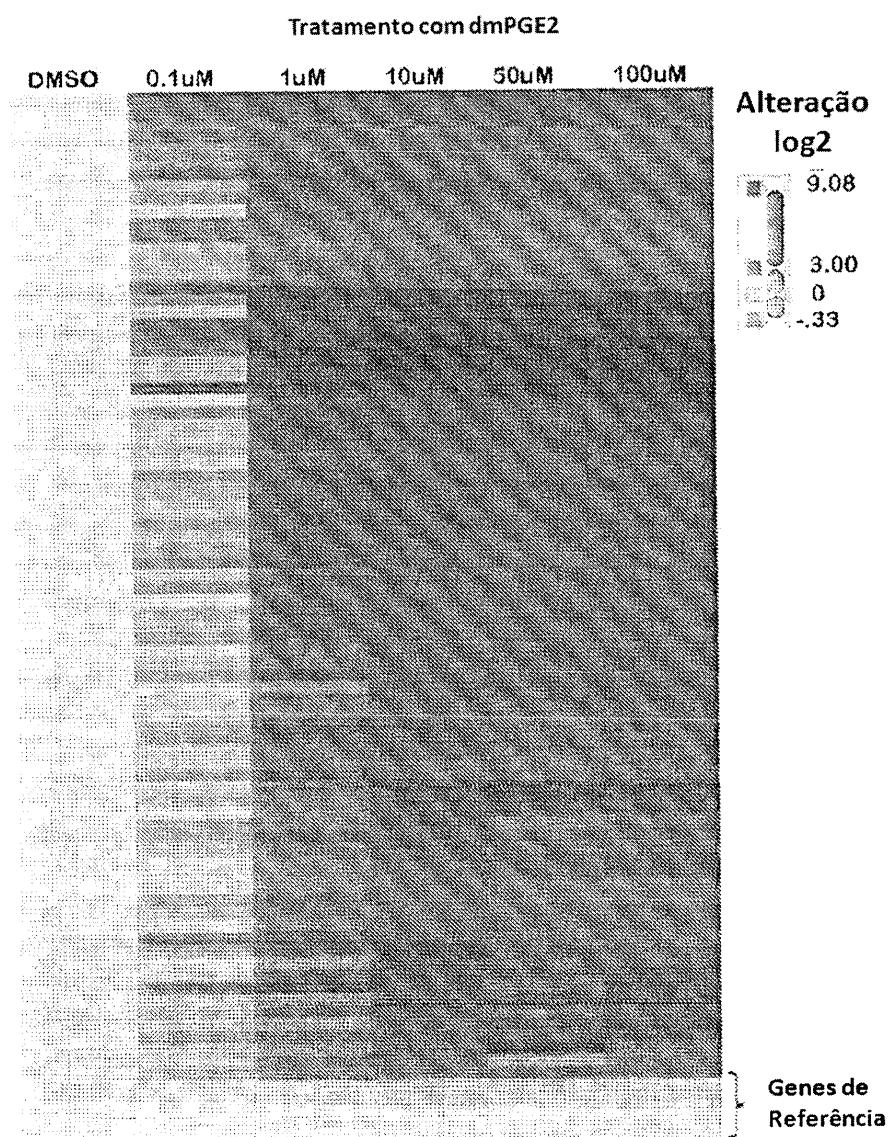


FIG. 16A

## Expressão de Gene (Todos Genes de Assinatura)

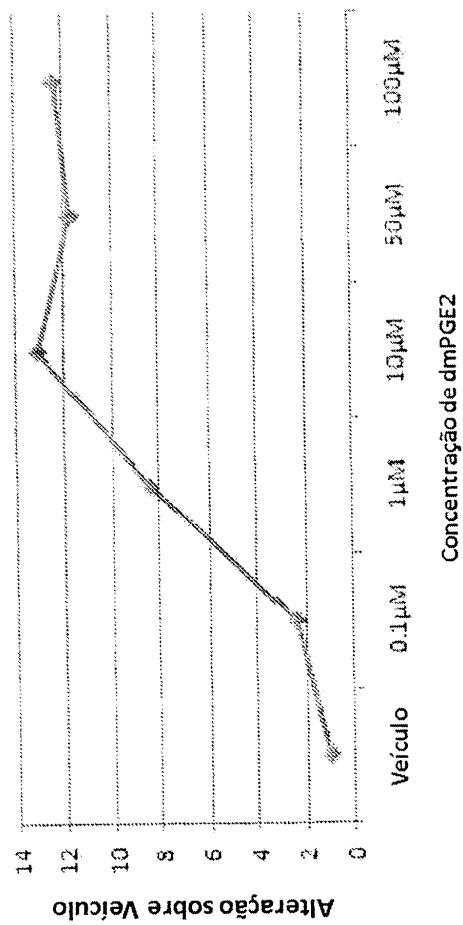
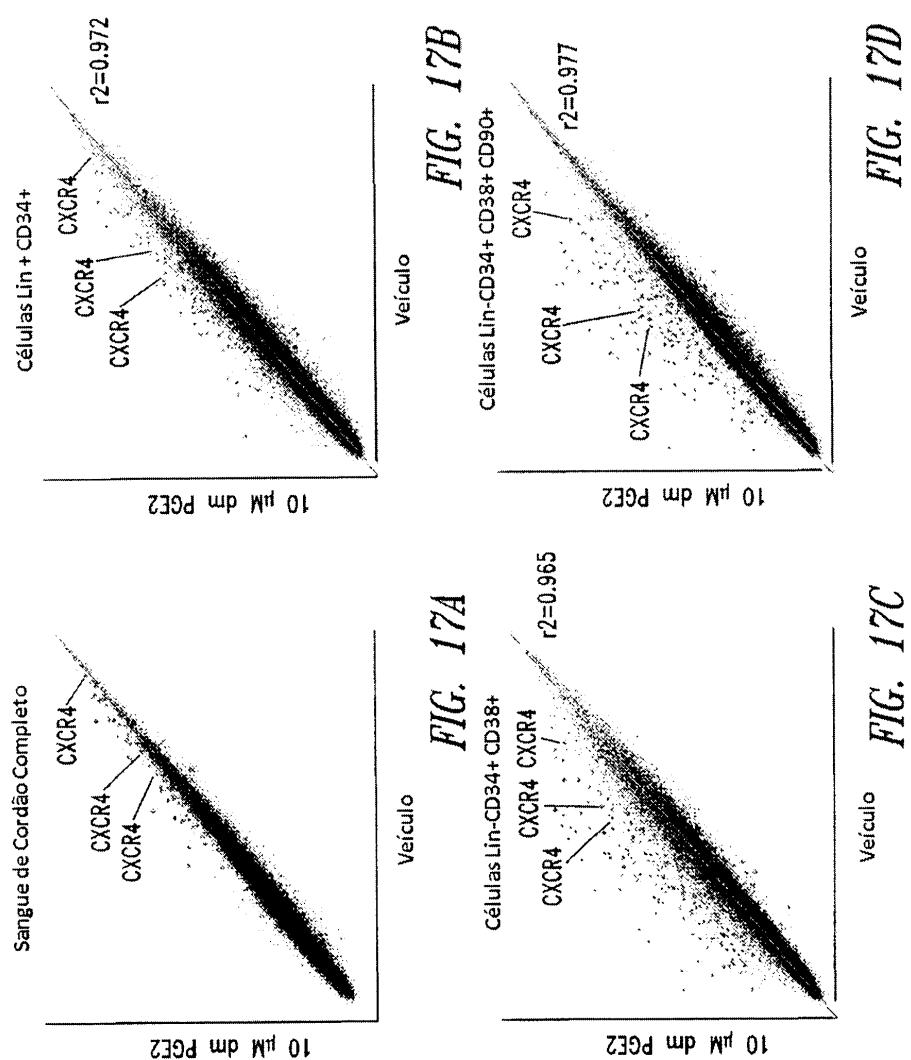


FIG. 16B



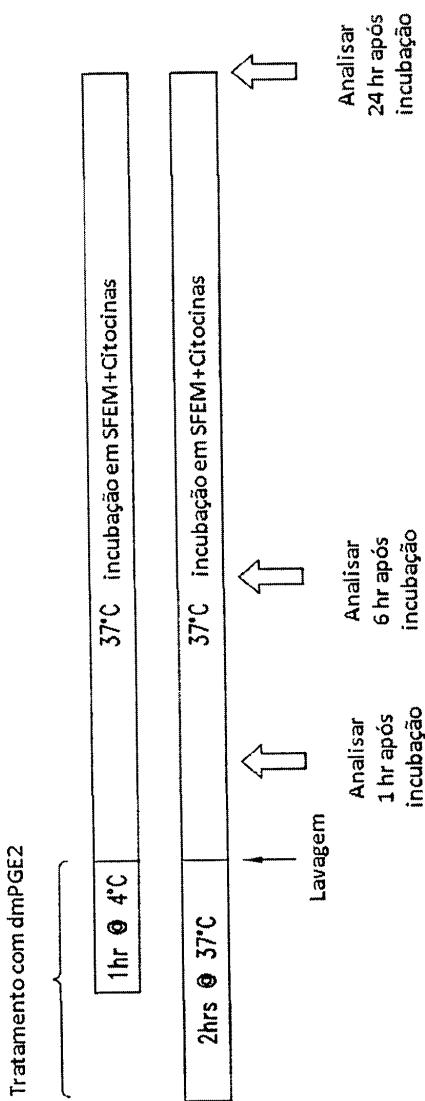


FIG. 18A

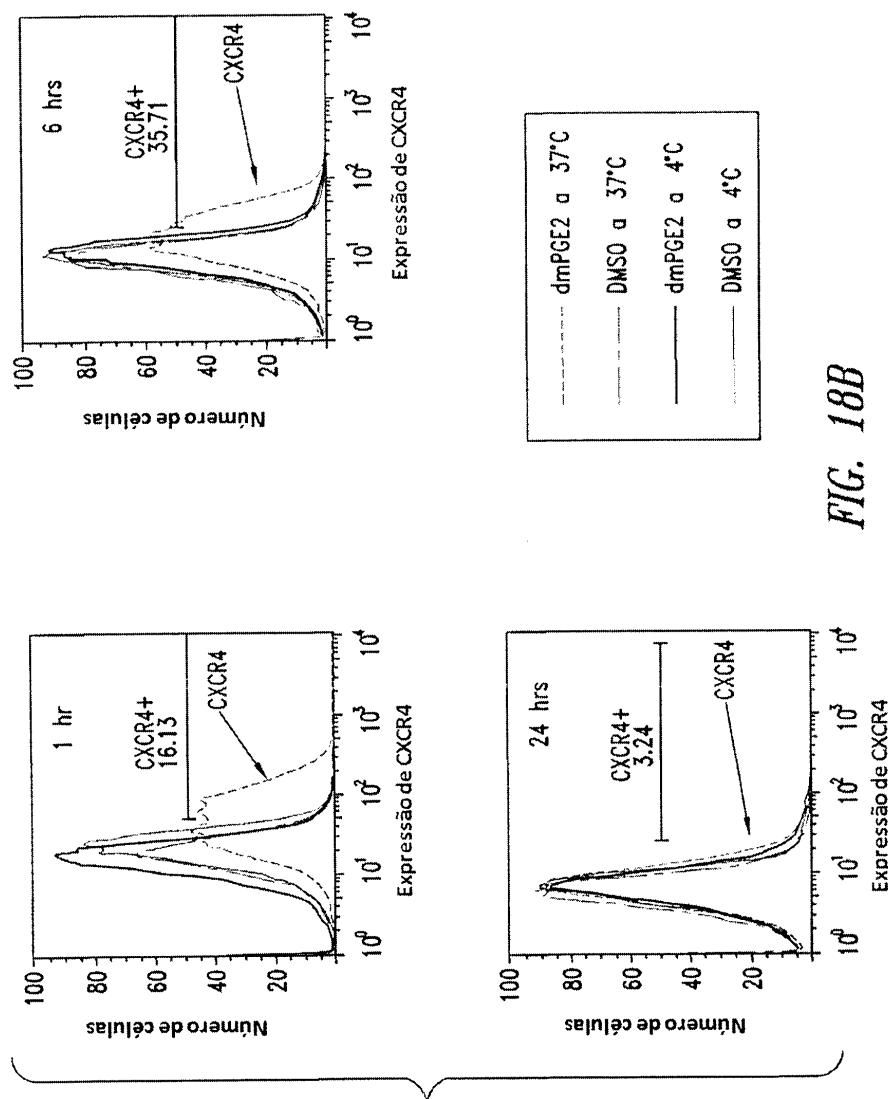


FIG. 18B

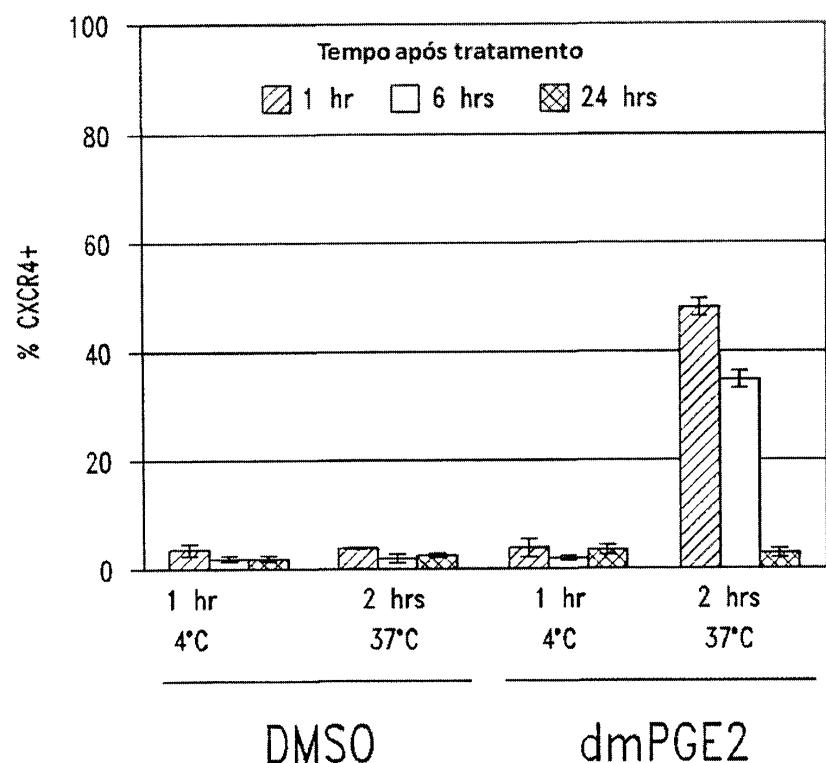


FIG. 18C

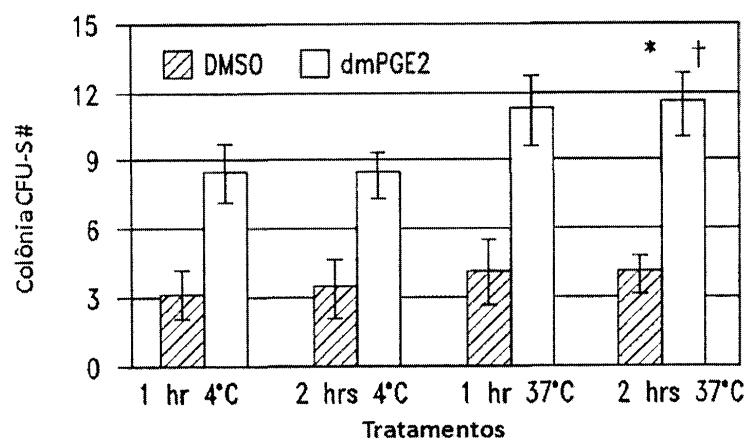


FIG. 19A

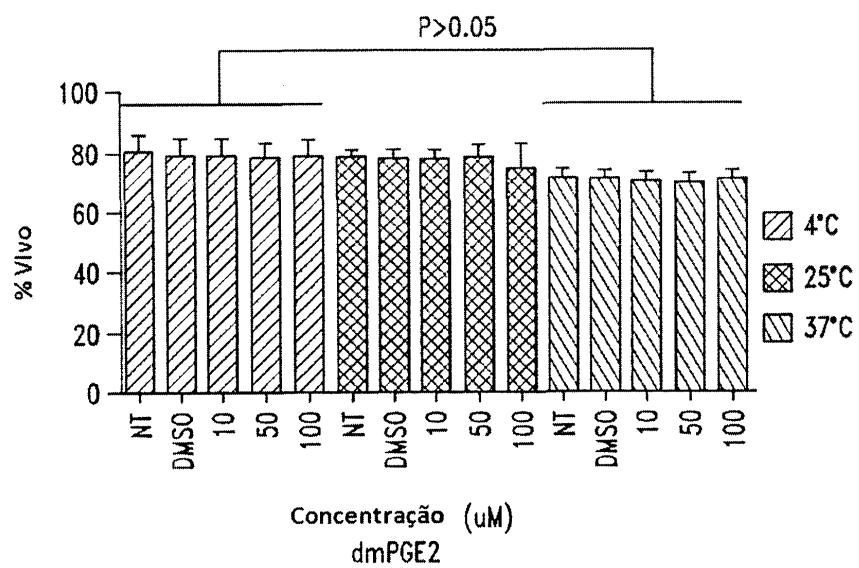


FIG. 19B

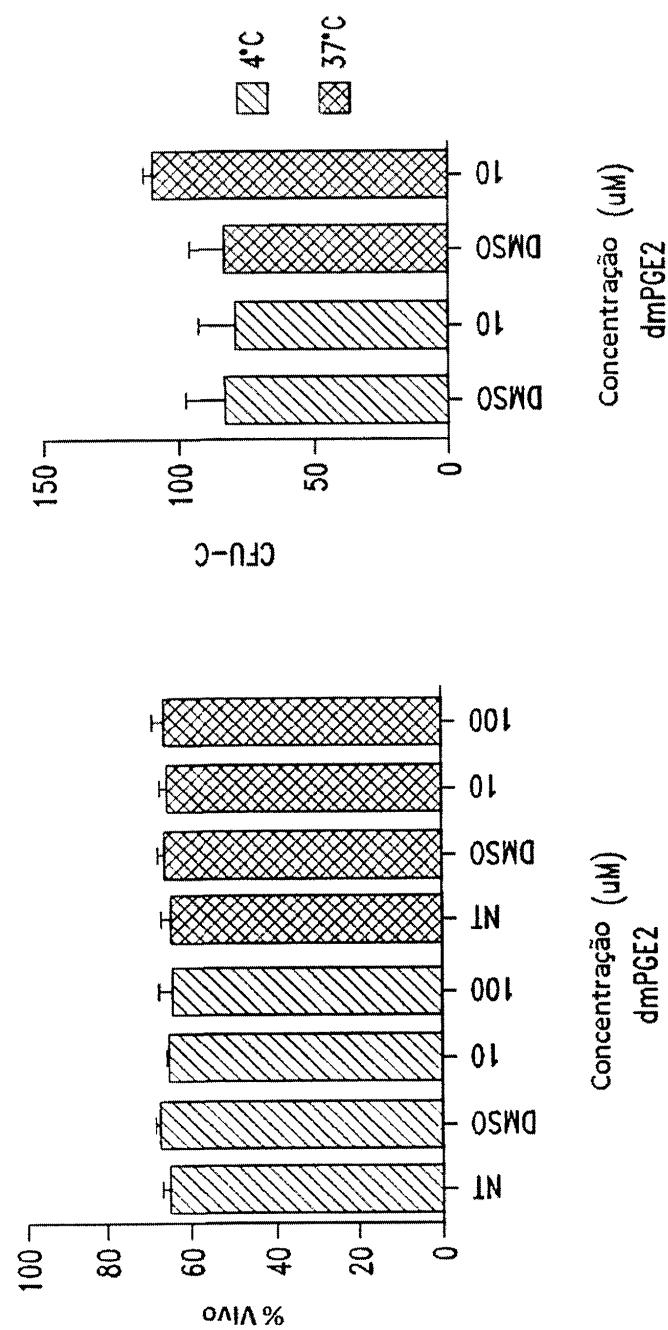


FIG. 19D

FIG. 19C

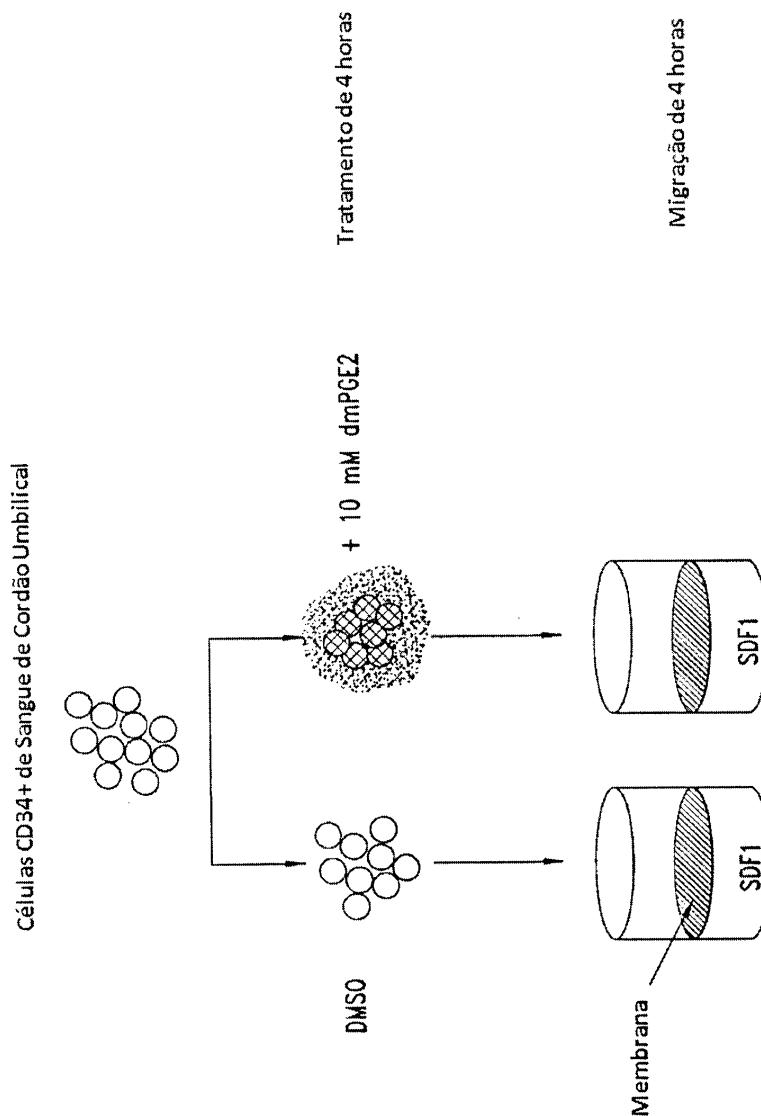


FIG. 20

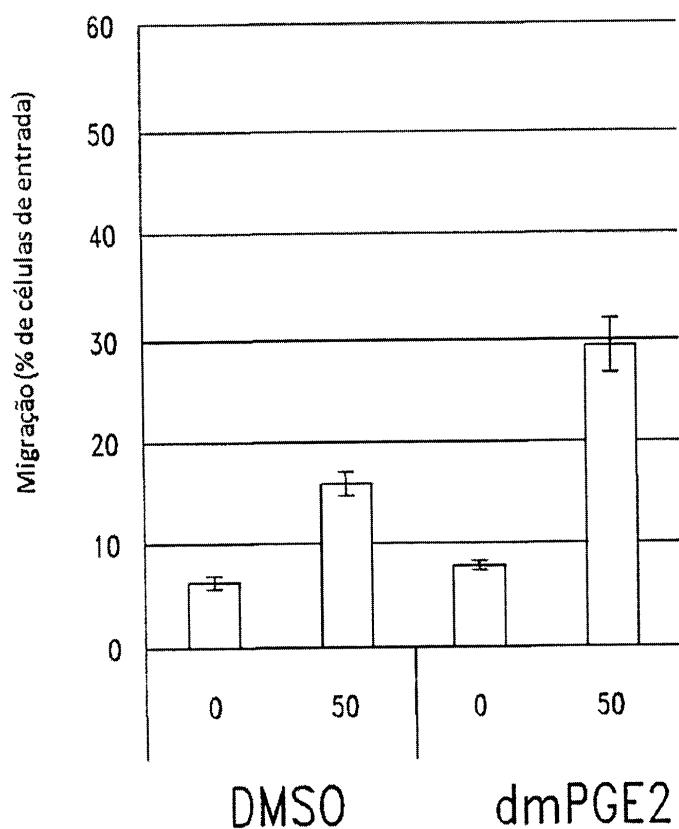
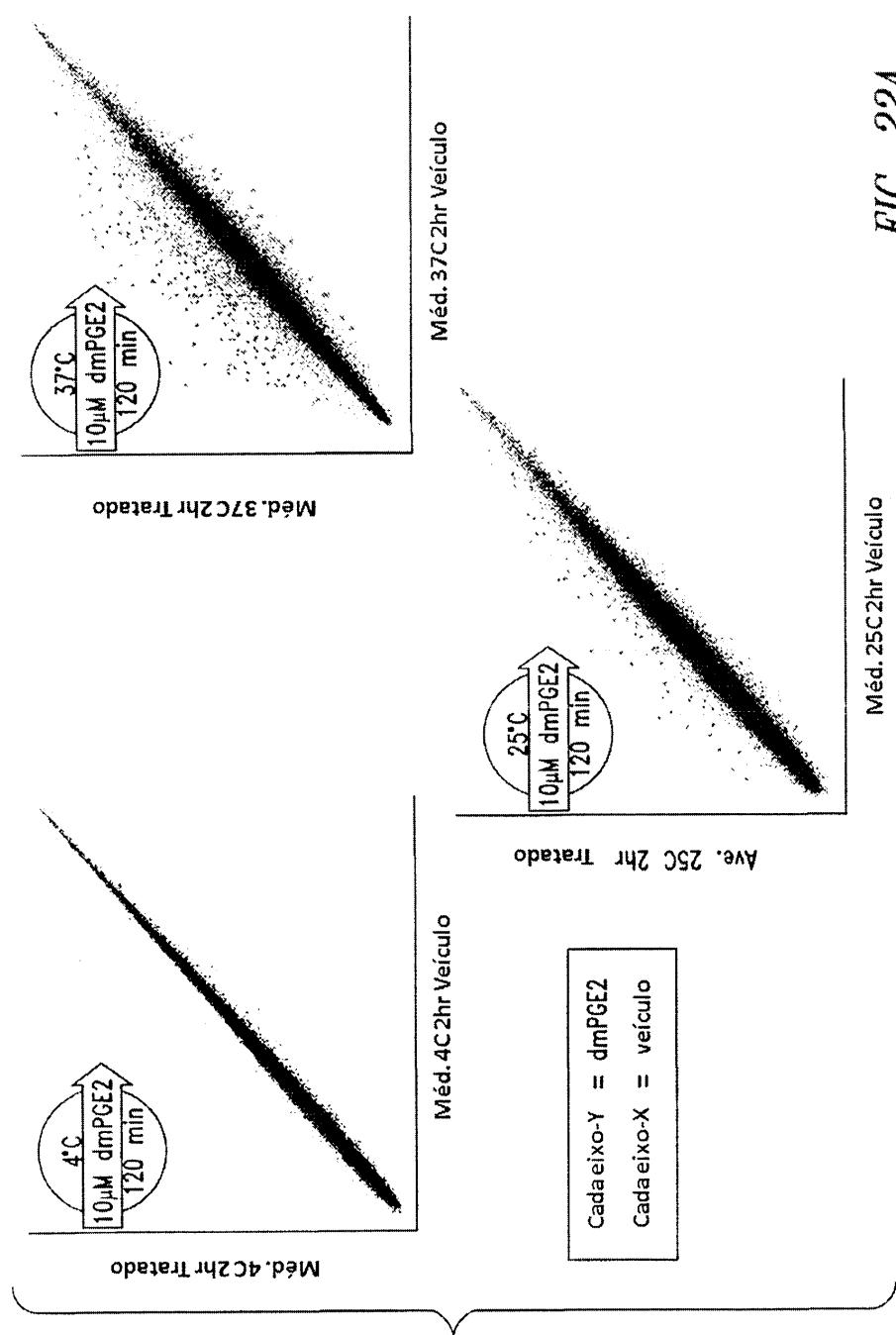


FIG. 21



Descrição	Alteração Méd. 4 deg 2h	Alteração Méd. 25 deg 2hr	Alteração Méd. 37 deg 2hr
Taquicinina	1.01	4.51	60.96
TAC1	0.98	12.45	43.13
HAS1	1.04	1.34	24.16
Proteina fosfatase 4 de especificidade dual	1.06	1.78	22.74
DUSP4	1.20	1.32	22.17
Anfíregulina	1.20	1.32	22.17
Proteina GEM de ligação a GTP	0.90	3.85	18.33
Proteína 1 relacionada a receptor nuclear	0.90	3.85	18.33
NR4A2	1.17	1.36	16.60
Renina	1.17	1.36	16.60
Ligante 6 de quimiocina CXC [ptn. quimiotática de granulócito:	1.14	1.03	15.87
CXCL6	1.14	1.03	15.87
CREM	1.01	1.98	12.97
Modulador de elemento responsivo - cAMP	1.01	1.98	12.97
COL1A1	1.06	4.15	12.83
Colágeno, tipo I, alfa 1	1.06	4.15	12.83
CXCL5	1.05	4.64	11.61
Ligante 5 de quimiocina CXC	1.05	4.64	11.61
CA2	0.96	4.15	10.63
Anidrase carbônica II	0.96	4.15	10.63
THBS1	1.04	2.31	8.70
Trombospondina 1	1.03	1.79	7.92
FOSL2	1.03	1.79	7.92
Antígeno 2 tipo FOS	1.05	2.79	7.76
CXCR4			

FIG. 22B

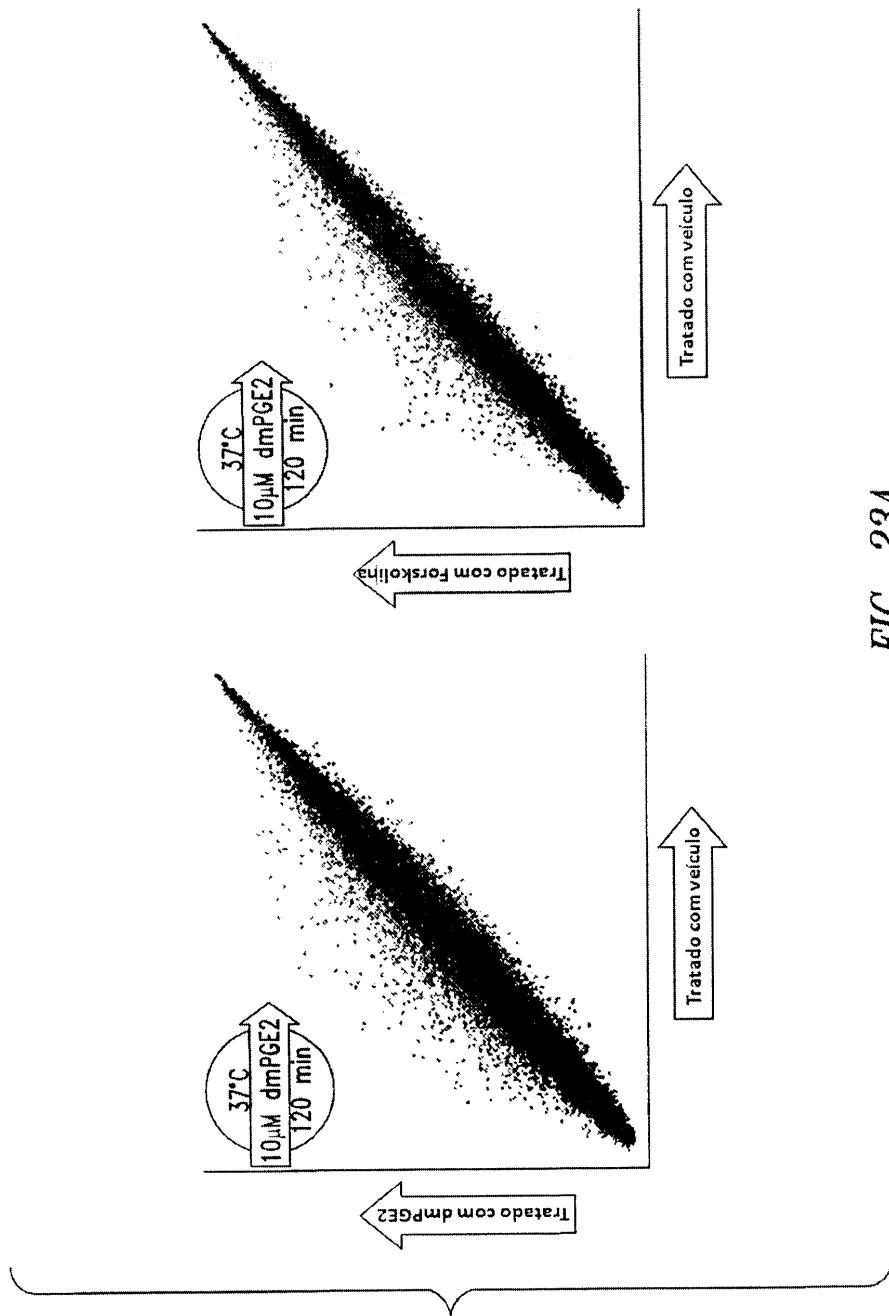


FIG. 23A

Symbolo do Gene	Descrição	Alteração Tratado dmPGE2	Alteração Tratado Forskolina
IAC1	Taquicinina	157.83	38.99
AREG	Anfíregulina	41.18	16.39
GEM	Proteina GEM de ligação a GTP	37.30	11.21
DUSP4	Proteína fosfatase 4 de especificidade dual	19.66	14.49
NR4A2	Proteína 1 relacionada a receptor nuclear	16.26	6.99
CXC16	Ligante 6 de quimiocina CXC [patr. quimiotática de granulócito:	19.20	9.25
CREM	Modulador de elemento responsivo – cAMP	12.09	9.34
FOSL2	Antígeno 2 tipo FOS	7.41	5.30
CXCL5	Ligante 5 de quimiocina CXC	12.09	6.84
THBS1	trombospondina 1	5.53	3.95
HAS1	Hialuronan sintase 1	11.32	7.37
CA2	anidrase carbônica II	6.46	3.14
CXCR4	Receptor 4 de quimiocina CXC	4.84	3.97
REN	Renina	3.38	8.53
VEGFA	Fator A de crescimento endotelial vascular	2.31	3.16

Symbolo do Gene	Descrição	Alteração Tratado 10uM dmPGE2	Alteração Tratado 1mM dbcAMP
GEM	Proteína GEM de ligação a GTP	93.06	57.09
NR4A2	Proteína 1 relacionada a receptor nuclear	73.70	36.25
DUSP4	Proteína fosfatase 4 de especificidade dual	40.30	19.28
AREG	Anfíregulina	29.68	17.04
CREM	Modulador de elemento responsivo – cAMP	15.50	7.88
CXCR4	Receptor 4 de quimiocina CXC	14.83	7.94
VEGFA	Fator A de crescimento endotelial vascular	14.70	14.18
FOSL2	Antígeno 2 tipo FOS	11.05	7.23
THBS1	trombospondina 1	9.72	6.91

FIG. 23B

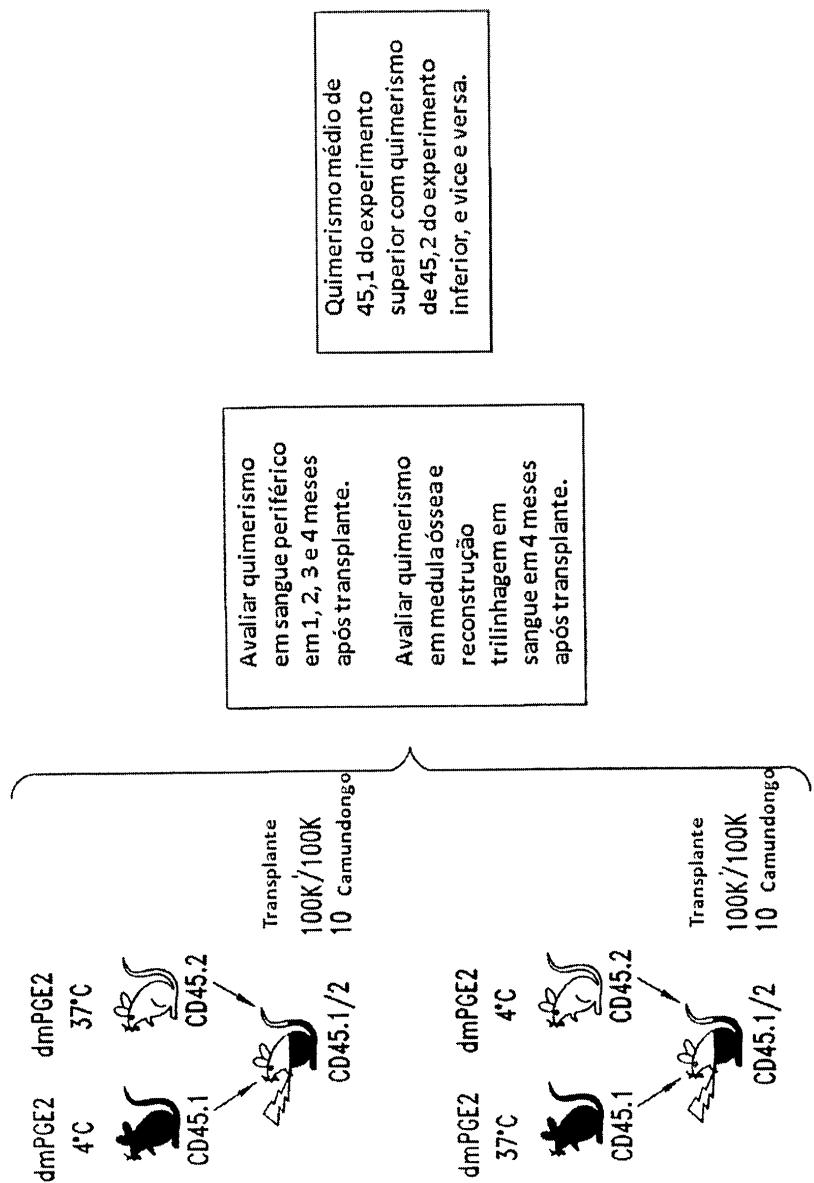


FIG. 24

RESUMO

“TERAPIA APERFEIÇOADA DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS E  
PROGENITORAS”

A invenção fornece métodos para terapia celular. Em particular, a invenção fornece  
5 composições terapêuticas de células tronco hematopoiéticas e/ou progenitoras modificadas contendo propriedades de enxerto e alojamento melhoradas, e métodos de preparação da composição terapêutica. A invenção ainda fornece métodos para melhorar a eficácia de transplante de célula tronco hematopoiética e progenitora incluindo transplantar a composição terapêutica aos sujeitos em necessidade de reconstituição do sistema hematopoiético.