



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

**(21) PI 0921999-4 A2**



**(22) Data do Depósito:** 23/11/2009

**(43) Data da Publicação Nacional:** 27/05/2010

---

**(54) Título:** USO DE CÉLULAS TRONCO PLACENTÁRIAS

**(51) Int. Cl.:** A01N 63/04; A01N 65/00; A61K 48/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 21/11/2008 US 61/117004.

**(71) Depositante(es):** ANTHROGENESIS CORPORATION.

**(72) Inventor(es):** ROBERT J. HARIRI; HERBERT FALECK; ANDREW ZEITLIN.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2009065509 de 23/11/2009

**(87) Publicação PCT:** WO 2010/060031 de 27/05/2010

**(85) Data da Fase Nacional:** 20/05/2011

**(57) Resumo:** USO DE CÉLULAS TRONCO PLACENTÁRIAS São aqui fornecidas composições e métodos de tratamento de indivíduos tendo uma doença, distúrbio ou condição do pulmão, que compreende administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias.

## “USO DE UMA QUANTIDADE TERAPEUTICAMENTE EFICAZ DE CÉLULAS TRONCO PLACENTÁRIAS”

O presente pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório U.S. Nº 61/117.004, depositado em 21 de novembro de 2008, a divulgação do qual é por meio deste incorporada por referência em sua totalidade.

### 1. CAMPO

São aqui fornecidos métodos e composições para o uso de células placentárias para tratar indivíduos tendo uma doença, distúrbio ou condição dos pulmões. Em certas formas de realização, a doença, distúrbio ou condição são causados por ou dizem respeito a, uma resposta imune indesejada ou nociva.

### FUNDAMENTOS

A doença pulmonar é o matador número três na América, responsável por uma em seis mortes. A doença pulmonar e outros problemas respiratórios constituem uma das causas principais de morte em bebês mais jovens do que 1 ano de idade. Atualmente, mais do que 35 milhões de americanos estão vivendo com doença pulmonar crônica tal como asma, e doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) de outro modo conhecida como enfizema e bronquite crônica. (sítio da web da American Lung Association, [www.lungusa.org/site/c.dvLUK900E/b,33316/](http://www.lungusa.org/site/c.dvLUK900E/b,33316/), baixado em 21 de novembro de 2008). Não existe tratamento adequado o suficiente para as doenças pulmonares, e novas terapias são urgentemente necessárias.

### SUMÁRIO

São aqui fornecidos métodos e composições para tratar, controlar, melhorar ou prevenir doenças, distúrbios e/ou condições do pulmão que compreendem administrar células placentárias ou células do cordão umbilical a um indivíduo em necessidade deste. Em certas formas de realização, a doença, distúrbio ou condição estão associados com ou causados por uma resposta imune, por exemplo, associada com, resultando em ou

causada por inflamação. Em certas formas de realização, as células placentárias ou células do cordão umbilical são células de plástico de cultura de tecidos aderentes, não trofoblásticas multipotentes aqui aludidas como células tronco placentárias, que são descritas em detalhes na Seção 4.2, abaixo.

Em uma forma de realização, é aqui fornecido um método de tratar um indivíduo tendo, suspeito de ter ou em risco de desenvolver uma doença, distúrbio ou condição do pulmão que compreende administrar ao indivíduo células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, ou meio condicionado pelas células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, de modo que melhora detectável em um ou mais sintomas de ou uma redução no progresso de um ou mais sintomas da dita doença, distúrbio ou condição ocorra. Em uma forma de realização específica, a dita doença, distúrbio ou condição são causados por uma resposta imune, por exemplo, inflamação. Em uma outra forma de realização específica, a dita doença, distúrbio ou condição resulta de uma causa além de uma resposta imune, por exemplo, inflamação. Em uma forma de realização específica, a dita doença, distúrbio ou condição resulta de uma causa outra que não uma resposta imune, por exemplo, inflamação.

Em uma forma de realização específica, a dita doença pulmonar, distúrbio ou condição é uma lesão pulmonar aguda. Em formas de realização mais específicas, a dita lesão pulmonar aguda é um ou mais de trauma físico, uma lesão química, por exemplo, uma queimadura química, inalação de fumaça ou exposição a uma substância tóxica. Em uma outra forma de realização específica, a dita doença pulmonar, distúrbio ou condição é uma lesão causada por uma doença neoplástica ou paraneoplástica.

Em certas formas de realização, a doença, distúrbio ou condição é um ou mais de uma doença fibrótica do pulmão, síndrome da angústia respiratória do adulto (ARDS), doença pulmonar obstrutiva crônica

(COPD), enfizema, asma, uma infecção viral ou bacteriana do pulmão, pneumonia (incluindo pneumonia quimicamente induzida) ou fibrose cística. Em uma forma de realização específica, a doença fibrótica do pulmão é doença pulmonar intersticial (doença pulmonar parenquimatosa difusa). Em formas de realização mais específicas, a doença pulmonar intersticial é silicose, asbestose, beriliose, esclerose sistêmica, polimiosite ou dermatomiosite. Em outras formas de realização mais específicas, a doença pulmonar intersticial é causada por um antibiótico, um medicamento quimioterapêutico, um medicamento antiarrítmico ou uma infecção.

10 Em certas formas de realização, a doença, distúrbio ou condição do pulmão estão associados com ou causados por uma resposta imune nociva, deletéria, inadequada ou indesejada, por exemplo, inflamação, em que a dita doença, distúrbio ou condição afeta ou manifesta sintomas nos pulmões. Em formas de realização específicas, a dita doença, distúrbio ou  
15 condição é um ou mais de lupo, por exemplo, lupo eritematoso, escleroderma ou uma doença reumatológica (por exemplo, artrite reumatóide).

Em uma outra forma de realização específica, a dita doença, distúrbio ou condição é doença pulmonar reumatóide (RLD), por exemplo, doença pulmonar reumatóide associada com artrite reumatóide. Em uma outra  
20 forma de realização específica, a administração é suficiente para causar uma melhora detectável em um ou mais sintomas de RLD ou suficiente para reduzir ou diminuir detectavelmente a progressão de um ou mais sintomas de RLD, por exemplo, em um pulmão do indivíduo. Em uma forma de realização mais específica, o dito sintoma de RLD é uma condição subordinada à RLD.  
25 Em uma forma de realização mais específica, a dita condição subordinada à RLD é uma infecção, por exemplo, uma infecção viral dos pulmões ou fibrose dos pulmões (por exemplo, como uma consequência de terapia com metotrexato).

Em uma outra forma de realização específica do método de

tratamento, as células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, foram geneticamente engendradas para expressar uma proteína de fusão que compreende IL-1Ra e DHFR.

Em uma outra forma de realização específica, a doença, distúrbio ou condição é lupo eritematoso, por exemplo, lupo eritematoso sistêmico (SLE). Em uma forma de realização mais específica, o dito sintoma de lupo eritematoso é um ou mais de inflamação pulmonar e/ou pleural, pleurisia, pleurite, efusão pleural, pneumonite de lupo ou doença pulmonar intersticial difusa crônica.

Em uma outra forma de realização específica de qualquer um dos métodos acima, o método compreende a administração de um segundo agente terapêutico ao indivíduo tendo a doença, distúrbio ou condição. Em uma forma de realização mais específica, o dito segundo agente terapêutico é um agente antiinflamatório, um agente imunomodulatório, e agente imunossupressivo, uma medicação para a dor ou um antibiótico. Em uma forma de realização mais específica, o segundo agente terapêutico é um agente imunomodulatório. Em uma outra forma de realização mais específica, o segundo agente é um anticorpo anti-CD3 (por exemplo, OKT3, muronomab), um anticorpo anti-receptor de IL-2 (por exemplo, basiliximab (SIMULECT®) e daclizumab (ZENAPAX®)), um anticorpo anti-receptor de célula T (por exemplo, Muromonab-CD3), azatioprina, um inibidor da calcineurina, um corticosteróide, ciclosporina, metotrexato, mercaptopurina, micofenolato mofetila, tacrolimus ou sirolimus. Em uma outra forma de realização mais específica, o segundo agente terapêutico compreende uma célula tronco de um outro tipo, por exemplo, uma célula tronco mesenquimatosa derivada da medula óssea, medula óssea ou uma célula tronco hematopoiética.

Em certas formas de realização, as células placentárias são fibroblastóide, aderentes à plástico de cultura de tecido, têm a capacidade para

diferenciar em células que demonstram uma ou mais características de uma célula osteogênica, célula condrogênica ou célula neurogênica, podem replicar entre cerca de 10 a 40 vezes em cultura, e/ou demonstrar características de marcadores celulares, como aqui descrito. Em uma forma de  
5 realização específica, as células placentárias são células tronco placentárias ou células placentárias multipotentes.

Em uma forma de realização específica, as células placentárias, por exemplo, as células tronco placentárias, são CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização, as células placentárias são  
10 adicionalmente CD200<sup>+</sup>. Já em uma outra forma de realização, as células placentárias são CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, e pelo menos um de: CD200<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD117<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, KDR<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, HLA-ABC<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>-</sup> ou PDL<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células placentárias expressam CD200 e HLA-G ou expressam CD73, CD105  
15 e CD200 ou expressam CD200 e OCT-4 (também conhecido como Octâmero-4; proteína de ligação de octâmero 4; POU5F1) ou expressam CD73, CD105 e HLA-G ou expressam CD73 e CD105 e facilitam a formação de um ou mais corpos como embrióide em uma população de células placentárias que compreende a dita célula tronco quando a dita população é cultivada sob  
20 condições que permitam a formação de um corpo como embrióide ou expressam OCT-4 e facilitam a formação de um ou mais corpos como embrióide em uma população de células placentárias que compreende dita célula tronco quando a dita população é cultivada sob condições que permitem a formação de um corpo como embrióide. Em uma forma de  
25 realização mais específica, as células placentárias suprimem a atividade de uma célula imune, por exemplo, suprime a proliferação de células T, por exemplo, células T CD4<sup>+</sup> ou células T CD8<sup>+</sup>.

As células placentárias, células tronco placentárias ou meio condicionado pelas células placentárias, por exemplo, células tronco

placentárias, podem ser administradas em uma dose única ou em doses múltiplas. Onde administradas em doses múltiplas, as doses podem ser parte de um regime terapêutico planejado para aliviar um ou mais sintomas agudos da doença, distúrbio ou condição, em que a doença, distúrbio ou condição são causados por ou estão associados com, uma resposta imune inadequada ou indesejável ou podem ser parte de um regime terapêutico de longa duração planejado para prevenir ou diminuir a severidade, de um curso crônico de uma tal doença, distúrbio ou condição. Quando um segundo agente terapêutico é administrado, a administração dos dois agentes pode ser concorrente ou sequencial.

### 3.1 DEFINIÇÕES

Como aqui usado, o termo “SH2” refere-se a um anticorpo que se liga a um epítipo no marcador CD105. Assim, as células que são aludidas como SH2<sup>+</sup> são CD105<sup>+</sup>.

Como aqui usado, os termos “SH3” e SH4” referem-se a anticorpos que ligam os epítopos presentes no marcador CD73. Assim, as células que são aludidas como SH3<sup>+</sup> e/ou SH4<sup>+</sup> são CD73<sup>+</sup>.

Como aqui usado, o termo “célula isolada,” por exemplo, uma célula tronco isolada, significa uma célula que é substancialmente separada de outras células do tecido, por exemplo, placenta ou cordão umbilical, dos quais a célula, por exemplo, célula tronco, é derivada. Uma célula é “isolada” se pelo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % ou pelo menos 99 % das células com as quais a célula está naturalmente associada são removidas da célula, por exemplo, durante a coleta e/ou cultura da célula.

Como aqui usado, o termo “população isolada de células” significa uma população de células que é substancialmente separada de outras células do tecido, por exemplo, placenta, da qual a população de células é derivada. Uma população, por exemplo, de células tronco é “isolada” se pelo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % ou pelo menos 99 % das células

com as quais a população de células tronco estão naturalmente associadas são removidas da população de células tronco, por exemplo, durante a coleta e/ou cultura da população de células tronco.

Como aqui usado, o termo “célula tronco placentária” refere-se a uma célula tronco ou célula progenitora que é derivada de uma placenta ou cordão umbilical de mamífero, independente de morfologia, marcadores da superfície de célula ou o número de passagens depois de uma cultura primária, que adere a um substrato de cultura de tecido (por exemplo, plástico de cultura de tecido ou um placa de cultura de tecido revestida com fibronectina). O termo “derivados,” neste contexto, inclui isolados primários de células tronco placentárias ou células tronco placentárias que foram expandidas em cultura. O termo “célula tronco placentária” como aqui usado, entretanto, não se refere a um trofoblasto, um citotrofoblasto, célula germinativa embrionária ou célula tronco embrionária, como aquelas células são entendidas pelas pessoas de habilidade na técnica. Em uma forma de realização, uma célula tronco placentária é uma célula multipotente, derivada de uma placenta de mamífero, que adere a um substrato de cultura de tecido, por exemplo, à plástico de cultura de tecido.

Como aqui usado, o termo “células placentárias” inclui células derivadas de placenta e células derivadas de cordão umbilical.

Como aqui usado, o termo “célula tronco do cordão umbilical” refere-se a uma célula tronco ou célula progenitora que é derivada de um cordão umbilical de mamífero, independente de morfologia, marcadores da superfície de célula ou do número de passagens depois de uma cultura primária, que adere a um substrato de cultura de tecido (por exemplo, plástico de cultura de tecido ou uma placa de cultura de tecido revestida com fibronectina). Em uma forma de realização, uma célula tronco do cordão umbilical é uma célula multipotente, derivada de um cordão umbilical de mamífero, que adere a um substrato de cultura de tecido, por exemplo, à

plástico de cultura de tecido.

Uma célula é considerada uma “célula tronco” se a célula retém pelo menos um atributo de uma célula tronco, por exemplo, um marcador ou perfil de expressão de gene associado com um ou mais tipos de células tronco; a capacidade para replicar pelo menos 10 a 40 vezes em cultura; multipotência, por exemplo, a capacidade para diferenciar, in vitro, in vivo ou ambos, em pelo menos um subconjunto de tipos de célula no corpo, por exemplo, de uma ou mais das três camadas germinativas, endoderma, mesoderma ou ectoderma; a falta de características de célula adulta (isto é, diferenciada) ou semelhante. Os termos “célula tronco placentária” e “célula tronco derivada de placenta” podem ser usados intercambiavelmente. As células tronco placentárias aqui divulgadas são, em certas formas de realização, multipotentes in vitro (isto é, as células diferenciam in vitro sob condições de diferenciação), multipotentes in vivo (isto é, as células diferenciam in vivo) ou ambos.

Como aqui usado, uma célula, por exemplo, célula tronco é “positiva” quanto a um marcador particular quando este marcador é detectável. Por exemplo, uma célula tronco placentária é positiva, por exemplo, quanto a CD73 porque CD73 é detectável nas células tronco placentárias em uma quantidade detectavelmente maior do que o fundo (em comparação, por exemplo, a um controle de isótipo). Uma célula é também positiva quanto a um marcador quando este marcador pode ser usado para distinguir a célula de pelo menos um outro tipo de célula ou pode ser usado para selecionar ou isolar a célula quando presente ou expressada pela célula. Marcadores expressados na superfície da célula, por exemplo, podem ser detectados usando a tecnologia de classificação de célula tal como citometria de fluxo. Marcadores, por exemplo, também podem ser detectados usando microarranjo de ácido nucléico ou tecnologia de RT-PCR.

Como aqui usado, “imunomodulação” e “imunomodulatório”

significa causar ou ter a capacidade para causar, uma mudança detectável em uma resposta imune.

Como aqui usado, “imunossupressão” e “imunossupressível” significa causar ou ter a capacidade para causar, uma redução detectável em uma resposta imune, e a capacidade para causar uma supressão detectável de uma resposta imune.

#### 4. DESCRIÇÃO DETALHADA

São aqui fornecidos métodos para o tratamento de um indivíduo tendo, suspeito de ter ou em risco de desenvolver uma doença, distúrbio ou condição de ou afetar, os pulmões, que compreende administrar ao indivíduo uma ou mais doses de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, meio condicionado pelas células placentárias, células do cordão umbilical, por exemplo, células tronco do cordão umbilical, e/ou meio condicionado por células do cordão umbilical. Em certas formas de realização, a doença, distúrbio ou condição estão associados com, surge de ou diz respeito a uma resposta imune inadequada, indesejada, nociva ou deletéria, por exemplo, uma doença autoimune. Os métodos para o tratamento de tais indivíduos, e para a administração de tais células tronco, sozinha ou em combinação com outras terapias, são debatidas em detalhes abaixo.

##### 4.1 TRATAMENTO DE DOENÇAS, DISTÚRBIOS OU CONDIÇÕES PULMONARES USANDO CÉLULAS PLACENTÁRIAS

Em uma forma de realização, é aqui fornecido um método de tratar um indivíduo tendo, suspeito de ter ou em risco de desenvolver uma doença, distúrbio ou condição do pulmão ou que o afeta que compreende administrar ao indivíduo um quantidade terapeuticamente eficaz de células do cordão umbilical, por exemplo, células tronco do cordão umbilical ou meio condicionado pelas células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias ou meio condicionado pelas células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, em que a dita quantidade terapeuticamente eficaz

causa uma melhora detectável em um ou mais sintomas de ou uma redução na progressão de um ou mais sintomas da dita doença, distúrbio ou condição ocorre. Também é aqui fornecido o uso de certas células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, na fabricação de um medicamento para tratar, controlar, melhorar ou prevenir doenças, distúrbios e/ou condições do pulmão. As células úteis nos métodos de tratamento aqui divulgados são descritas ainda na Seção 4.2, abaixo.

Em certas formas de realização, a doença, distúrbio ou condição do pulmão ou que o afeta é uma doença, distúrbio ou condição do pulmão ou que o afeta não causados por uma doença autoimune ou a ela relacionados. Em formas de realização específicas, a doença, distúrbio ou condição do pulmão ou que o afeta não estão relacionados com a doença do enxerto versus hospedeiro, lupo eritematoso sistêmico, doença do intestino inflamatório ou artrite reumatóide (por exemplo, não é uma doença pulmonar reumatóide) ou por elas causados. Em certas outras formas de realização, a doença, distúrbio ou condição do pulmão ou que o afeta não são causados por inflamação ou com ela relacionados (por exemplo, não são causados pela inflamação do pulmão ou não são causados por uma resposta inflamatória em um tecido não pulmonar, etc.).

Em uma forma de realização específica de qualquer uma das formas de realização neste, as células placentárias são células placentárias multipotentes. Em uma outra forma de realização específica, as células placentárias são células tronco placentárias. Em uma outra forma de realização específica, as células placentárias são células tronco placentárias multipotentes. As células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, usadas nos métodos aqui descritos podem ser derivadas ou obtidas de uma única placenta ou de placentas múltiplas. As células placentárias também podem ser derivadas de uma única espécie, por exemplo, a espécie do receptor pretendido ou pode ser derivada de espécies múltiplas.

“Derivados,” como aqui usado, significa isolados da placenta ou cordão umbilical ou expandidos de células isoladas da placenta ou cordão umbilical.

#### 4.1.1 Tratamento de Doenças ou Distúrbios Pulmonares Intersticiais

Em certas formas de realização, a doença, distúrbio ou condição do pulmão tratáveis usando células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, é uma doença pulmonar intersticial (também conhecida como doença pulmonar parenquimatosa difusa). Assim, é aqui fornecido um método de tratar um indivíduo tendo uma doença pulmonar intersticial, que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, ao dito indivíduo, por exemplo, ao pulmão afetado do dito indivíduo. Em uma forma de realização específica, o método de tratamento compreende avaliar o dito indivíduo quanto a melhora em um ou mais parâmetros da função pulmonar depois da dita administração (por exemplo, de 7 dias a 30 dias depois), em que os ditos parâmetros de função pulmonar são volume respiratório forçado em um segundo (FEV<sub>1</sub>); capacidade vital de volume forçado (FVC); FEV<sub>1</sub>/FVC; fluxo expiratório de pico (PEF); fluxo expiratório forçado 25 % a 50 % ou 25 % a 75 % (fluxo médio de ar que sai do pulmão durante a porção intermediária da expiração); tempo expiratório forçado (FET); capacidade pulmonar total (TLC); capacidade de difusão, monóxido de carbono (DLCO); ou ventilação voluntária máxima. Em uma forma de realização mais específica, a dita administração resulta na melhora de um ou mais dos ditos parâmetros de função pulmonar (1) para 80 % ou mais do esperado; ou (2) em pelo menos 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 50 %.

Em uma forma de realização mais específica, o método compreende identificar qualquer um dos ditos parâmetros que, antes da administração, são menores do que 80 % dos valores esperados para um indivíduo da mesma altura e peso, e avaliar os ditos parâmetros depois da dita administração, em que a dita administração resulta na melhora de um ou mais dos ditos

parâmetros da função pulmonar (1) para 80 % ou mais do esperado; ou (2) em pelo menos 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 50 %.

Em certas formas de realização, a doença pulmonar intersticial não é uma doença das vias aéreas obstrutiva ou doença pulmonar obstrutiva.

5 Tais doenças podem envolver a inflamação do interstício, o tecido e espaço em torno dos sacos de ar dos pulmões. Em certas formas de realização, a doença pulmonar intersticial não é causada pela inflamação. Os sintomas de doença pulmonar intersticial incluem, sem limitação, falta de ar (particularmente com esforço); fadiga; fraqueza; perda de apetite; perda de  
10 peso; tosse seca, não produtiva (pouca ou nenhuma produção de muco); desconforto no peito; respiração forçada; ou evidência de hemorragia em um ou ambos os pulmões.

É aqui fornecido um método de tratar um indivíduo tendo uma doença ou distúrbio pulmonares intersticiais (por exemplo, uma doença  
15 pulmonar parenquimatosa difusa), que compreende administrar ao dito indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias. Em uma forma de realização específica, a quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias é uma quantidade que, permanente ou transitoriamente, resulta em uma melhora detectável em  
20 ou diminuição da piora de, um ou mais sintomas da dita doença pulmonar intersticial. Em uma forma de realização específica, o dito sintoma é uma capacidade abaixo do normal de um pulmão do indivíduo para difundir monóxido de carbono (por exemplo, baixa capacidade de difusão de monóxido de carbono (DLCO) comparado ao normal). Em certas formas de  
25 realização mais específicas, o dito um ou mais sintomas de doença pulmonar intersticial compreende falta de ar (particularmente com esforço); fadiga; fraqueza; perda de apetite; perda de peso; tosse seca, não produtiva (pouco ou nenhuma produção de muco); desconforto no peito; respiração forçada; ou evidência de hemorragia em um ou ambos os pulmões.

Em certas formas de realização específicas, a dita administração de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, resulta em uma melhora detectável em uma ou mais medidas de função pulmonar no dito indivíduo, por exemplo, como evidenciado pela

5 espirometria, monitoramento de fluxo de pico, volume respiratório forçado ou semelhante. Em uma forma de realização mais específica, a dita administração resulta em um aumento de pelo menos 5 %, 10 %, 15 % ou 20 % de difusão de monóxido de carbono, quando comparados à difusão de monóxido de carbono antes da administração, em um pulmão do dito

10 indivíduo. Em certas outras formas de realização específicas, a dita administração de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, resulta em uma melhora detectável em um ou mais de um raio X do tórax, varredura de CT, MRI, broncoscopia ou varredura similar (por exemplo, melhora visível na aparência do pulmão). Em uma outra forma de

15 realização específica, a dita administração de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, resulta em uma melhora detectável no nível de dióxido de carbono detectável no sangue (por exemplo, movimento de níveis de CO<sub>2</sub> para dentro de uma faixa normal).

Em uma forma de realização específica, a doença pulmonar

20 intersticial não é causada pelo lupo eritematoso. Em uma forma de realização mais específica, a dita doença pulmonar intersticial não é doença pulmonar intersticial difusa crônica.

Em certas formas de realização, a doença pulmonar intersticial é uma doença pulmonar intersticial com fibrose (por exemplo, uma doença

25 fibrótica pulmonar), tal como fibrose intersticial pulmonar. Em certas formas de realização, a doença pulmonar intersticial, por exemplo, a doença fibrótica pulmonar, é a pneumonia pulmonar idiopática, fibrose pulmonar idiopática (alveolite fibrosante criptogênica), pneumoconiose, asbestose, baritose, fibrose da bauxita, beriliose, síndrome de Caplan, calicose, pneumoconiose

dos carvoeiros, sarcoidose pulmonar, siderose, silicose, bissinose, pneumonite de hipersensibilidade, bagaçose, pulmão do ornitófilo ou pulmão do fazendeiro.

#### 4.1.2 Tratamento de Doenças e Distúrbios Pulmonares obstrutivos

5                   Em certas formas de realização, a doença, distúrbio ou condição do pulmão tratáveis usando células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, é uma doença ou distúrbio pulmonar obstrutivos. Assim, é aqui fornecido um método de tratar um indivíduo tendo uma doença ou distúrbio pulmonar obstrutivos, que compreende administrar uma  
10                   quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, ao dito indivíduo, por exemplo, ao pulmão afetado do dito indivíduo. Em uma forma de realização específica, o método de tratamento compreende avaliar o dito indivíduo quanto a melhora em um ou mais parâmetros de função pulmonar depois da dita administração (por  
15                   exemplo, de 7 dias a 30 dias depois), em que os ditos parâmetros de função pulmonar são volume respiratório forçado em um segundo ( $FEV_1$ ); capacidade vital de volume forçado (FVC);  $FEV_1/FVC$ ; fluxo expiratório de pico (PEF); fluxo expiratório forçado 25 % a 50 % ou 25 % a 75 % (fluxo médio de ar que sai do pulmão durante a porção intermediária da expiração);  
20                   tempo expiratório forçado (FET); capacidade pulmonar total (TLC); capacidade de difusão, monóxido de carbono (DLCO); ou ventilação voluntária máxima. Em uma forma de realização mais específica, a dita administração resulta na melhora de um dos ditos parâmetros de função pulmonar (1) para 80 % ou mais do esperado; ou (2) em pelo menos 2 %, 3  
25                   %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 50 %. Em uma outra forma de realização mais específica, o método compreende identificar qualquer um dos ditos parâmetros que, antes da administração, são menores do que 80 % dos valores esperados para um indivíduo da mesma altura e peso, e avaliar os ditos parâmetros depois da dita administração, em que a dita administração resulta

na melhora em um ou mais dos ditos parâmetros de função pulmonar (1) para 80 % ou mais do esperado; ou (2) em pelo menos 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 50 %.

Em formas de realização específicas, a doença pulmonar obstrutiva é a síndrome da angústia respiratória do adulto (ARDS), asma, bronquioectasia, bronquiolectasia, bronquiolite, bronquite, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) ou enfizema. Em uma outra forma de realização específica, a doença ou distúrbio pulmonar obstrutivos não são causados por uma doença autoimune. Em uma forma de realização mais específica, a dita doença ou distúrbio pulmonar obstrutivos não são causados pela doença do intestino inflamatório ou doença do enxerto versus hospedeiro.

Assim, é aqui fornecido um método de tratar um indivíduo tendo uma doença ou distúrbio pulmonar obstrutivos, que compreende administrar ao dito indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias. Em uma forma de realização específica, a quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias é uma quantidade que, permanente ou transitoriamente, resulta em uma melhora detectável em ou diminuição da piora de, um ou mais sintomas da dita doença ou distúrbio pulmonar obstrutivos.

Em uma forma de realização específica, a dita doença ou distúrbio pulmonar obstrutivos é doença pulmonar obstrutiva crônica, por exemplo, como diagnosticado por uma razão do volume de ar expiratório forçado em 1 segundo ( $FEV_1$ ) para capacidade vital forçada (FVC) de menos do que 0,7. Em uma forma de realização mais específica, a dita quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, é uma quantidade que resulta em uma elevação detectável na razão de  $FEV_1/FEC$  acima de 0,7 depois da administração, por exemplo, uma elevação de 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10 ou mais ou mais.

Em uma outra forma de realização específica, a dita doença ou distúrbio pulmonar obstrutivos é asma. Em formas de realização mais específicas, a dita quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, é uma quantidade que resulta em uma melhora detectável em um ou mais sintomas da asma, por exemplo, obstrução das vias aéreas, como determinada pela espirometria ou um fluxímetro de pico.

O tratamento de uma doença, distúrbio ou condição pulmonar obstrutiva pode compreender a administração de um segundo composto terapêutico. Em formas de realização específicas, por exemplo, em que a doença, distúrbio ou condição do pulmão é a asma, a segunda composição terapêutica ou terapia secundária podem compreender um ou mais de um composto terapêutico inalado ou composto terapêutico tomado oralmente, por exemplo, sem limitação, corticosteróides inalados (por exemplo, hidrocortisona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, dexametasona, betametasona, triancinolona, beclometasona, acetato de fludrocortisona, acetato de desoxicortisona, aldosterona ou semelhante) ou agonistas beta inalados (por exemplo, salbutamol, levosalbutamol, terbutalina, pirbuterol, procaterol, metaproterenol, fenoterol, bitolterol, salmeterol, formoterol, bambuterol, clenbuterol, indacaterol ou semelhante), inibidores de leucotrieno (por exemplo, zileuton, MK-866, montelukast, zafirlukast ou semelhante).

Em outras formas de realização específicas, em que a doença, distúrbio ou condição do pulmão é, por exemplo, COPD, a segunda composição terapêutica ou terapia secundária podem compreender um ou mais de um agonista beta inalado (ver a lista de agonistas beta citados no debate de tratamento da asma, acima); ou anticolinérgicos (por exemplo, brometo de ipratrópio (Atrestufat), brometo de oxitrópio (Oxivent), tiotrópio (Spiriva) ou semelhante).

#### 4.1.3 Tratamento de Doenças, Distúrbios ou Condições Pulmonares Causados

por uma Resposta Imune

Em certas formas de realização, é aqui fornecido um método de tratar um pulmão de um indivíduo tendo uma doença, distúrbio ou condição do pulmão associados com ou causados por uma resposta imune nociva, deletéria, inadequada ou indesejada, que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, ao dito indivíduo, por exemplo, a um pulmão afetado do dito indivíduo. Em certas formas de realização, a doença, distúrbio ou condição pulmonares, por exemplo, são uma doença alérgica ou autoimune que afeta os pulmões. Em uma forma de realização específica, a dita doença, distúrbio ou condição são um distúrbio ou doença pulmonares associados com ou causados pelo lupo, por exemplo, lupo eritematoso sistêmico, escleroderma, doença do enxerto versus hospedeiro ou artrite reumatóide (por exemplo, doença pulmonar reumatóide).

Em uma forma de realização específica, o método de tratamento compreende identificar, em um indivíduo tendo uma resposta imune inadequada, por exemplo, uma doença autoimune, um sintoma da dita resposta imune no pulmão; administrar células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, ao dito indivíduo, por exemplo, ao pulmão afetado do dito indivíduo; e avaliar o dito indivíduo quanto à melhora em um ou mais parâmetros de função pulmonar depois da dita administração (por exemplo, de 7 dias a 30 dias depois), em que os ditos parâmetros de função pulmonar são volume respiratório forçado em um segundo (FEV<sub>1</sub>); capacidade vital de volume forçado (FVC); FEV<sub>1</sub>/ FVC; fluxo expiratório de pico (PEF); fluxo expiratório forçado 25 % a 50 % ou 25 % a 75 % (fluxo médio de ar que sai do pulmão durante a porção intermediária da expiração); tempo expiratório forçado (FET); capacidade pulmonar total (TLC); capacidade de difusão, monóxido de carbono (DLCO); ou ventilação voluntária máxima. Em uma forma de realização mais específica, a dita administração resulta na melhora

de um dos ditos parâmetros de função pulmonar (1) para 80 % ou mais do esperado; ou (2) em pelo menos 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % ou 10 % ou mais. Em uma forma de realização mais específica, o método compreende identificar qualquer um dos ditos parâmetros que, antes da  
 5 administração, são menores do que 80 % dos valores esperados para um indivíduo da mesma altura e peso, e avaliar os ditos parâmetros depois da dita administração, em que a dita administração resulta na melhora de um ou mais dos ditos parâmetros de função pulmonar (1) para 80 % ou mais do esperado; ou (2) em pelo menos 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % ou 10 % ou  
 10 mais.

Em certas formas de realização, as células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, usadas no método suprime uma resposta imune quando contatada com uma pluralidade de células imunes (por exemplo, células T CD4<sup>+</sup>, células T CD8<sup>+</sup> ou células matadoras naturais  
 15 (NK)) in vivo, por exemplo, em um indivíduo afligido com a dita doença, distúrbio ou condição que afeta os pulmões. Em várias formas de realização específicas, o dito contato é suficiente para suprimir uma função imune associada com ou causativa da dita doença, distúrbio ou condição pulmonares em pelo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % ou 95 %, comparada com a  
 20 função imune no indivíduo afetado na ausência das células tronco placentárias.

O contato de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, com células imunes pode ocorrer in vivo no contexto de ou como um subordinado a, por exemplo, enxerto ou transplante de um ou mais  
 25 tipos de tecidos a um indivíduo receptor. Tais tecidos podem ser, por exemplo, tecido pulmonar. A este respeito, as células tronco placentárias podem ser usadas para suprimir uma ou mais respostas imunes de uma ou mais células imunes contidas dentro do indivíduo receptor, dentro do tecido pulmonar transplantado ou ambos. O contato pode ocorrer antes, durante e/ou

depois do enxerto ou transplante. Por exemplo, as células tronco placentárias podem ser administradas no momento do transplante ou enxerto. As células placentárias também podem ou alternativamente, ser administradas antes do transplante ou enxerto, por exemplo, cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dias antes do transplante ou enxerto. As células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, também podem ou alternativamente, ser administradas a um receptor de transplante ou enxerto depois do transplante ou enxerto, por exemplo, cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dias depois do transplante ou enxerto. Preferivelmente, as células placentárias são contatadas com as células imunes antes de qualquer sinal ou sintoma detectáveis de uma resposta imune, pelo indivíduo receptor ou pelo tecido ou enxerto transplantados, por exemplo, um sinal ou sintoma detectáveis de doença do enxerto versus hospedeiro ou inflamação detectável, sejam detectáveis.

Tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio, doença ou condição pulmonares associados com, piorados por ou causados por uma resposta imune indesejada ou nociva pode adicionalmente compreender a administração ao indivíduo de um ou mais agentes imunossupressivos, particularmente no contexto in vivo. Em uma forma de realização, a pluralidade de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, são contatadas com a pluralidade de células imunes in vivo em um indivíduo, e uma composição que compreende um agente imunossupressivo é administrado ao indivíduo tendo a doença, distúrbio ou condição pulmonares. Agentes imunossupressivos são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, anticorpos anti-receptor de célula T (monoclonais ou policlonais ou fragmentos de anticorpo ou derivativos destes), anticorpos anti-receptor de IL-2 (por exemplo, Basiliximab (SIMULECT<sup>®</sup>) ou daclizumab (ZENAPAX<sup>®</sup>), anticorpos anti-receptor de célula T (por exemplo, Muromonab-CD3), azatioprina, corticosteróides, ciclosporina, tacrolimus, micofenolato mofetila, sirolimus, inibidor da calcineurinas, e outros. Em uma

forma de realização específica, o agente imunossupressivo é um anticorpo neutralizador para a proteína inflamatória de macrófago (MIP)-1 $\alpha$  ou MIP-1 $\beta$ . Preferivelmente, o anticorpo anti-MIP-1 $\alpha$  ou MIP-1 $\beta$  é administrado em uma quantidade suficiente para causar uma redução detectável na quantidade de MIP-1 $\alpha$  e/ou MIP-1 $\beta$  no dito indivíduo, por exemplo, no momento do transplante.

Em certas formas de realização, um indivíduo tendo uma doença, distúrbio ou condição pulmonares é tratado pela administração de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, e, opcionalmente, um ou mais agentes terapêuticos, em qualquer tempo durante a progressão da doença. Por exemplo, o indivíduo pode ser tratado imediatamente depois do diagnóstico ou dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6 dias do diagnóstico ou dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ou mais semanas ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais anos depois do diagnóstico. O indivíduo pode ser tratado uma vez ou múltiplas vezes durante o curso clínico da doença. O indivíduo pode ser tratado, como apropriado, durante um ataque agudo, durante a remissão ou durante uma fase degenerativa crônica.

Em uma forma de realização específica, o tratamento de uma doença, distúrbio ou condição do pulmão relacionados com a ou causados por uma resposta imune inadequada, deletéria ou nociva compreende a administração de uma população de um segundo tipo de célula, por exemplo, células tronco, além das células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias. Em uma forma de realização específica, as ditas células tronco são células tronco mesenquimatosas, por exemplo, células tronco mesenquimatosas derivadas da medula óssea. Em outras formas de realização, o segundo tipo de células são células tronco multipotentes, células tronco pluripotentes, células progenitoras, células tronco hematopoiéticas, por exemplo, células tronco hematopoiéticas CD34<sup>+</sup> (por exemplo, contidas

dentro da medula óssea ou sangue do cordão não processados ou células isoladas da medula óssea ou sangue do cordão), células tronco adultas, células tronco embrionárias ou células germinativas embrionárias. O segundo tipo de célula, por exemplo, célula tronco mesenquimatosa, pode ser administrado com as células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, em qualquer razão, por exemplo, uma razão de cerca de 100:1, 75:1, 50:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:50, 1:75 ou 1:100. As células tronco mesenquimatosas podem ser obtidas comercialmente ou de uma fonte original, por exemplo, medula óssea, aspirado de medula óssea, tecido adiposo, e outros.

#### 4.1.3.1 Distúrbios Pulmonares Associados com a Doença do Enxerto Versus Hospedeiro

Em certas formas de realização, é aqui fornecido um método de tratar um indivíduo, por exemplo, um receptor de transplante ou indivíduo que receberá ou recebeu, um transplante, que compreende administrar ao indivíduo, por exemplo, um pulmão afetado do indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias. Em certas formas de realização, o transplante é um transplante de pulmão ou um enxerto de uma parte de um pulmão. Em certas outras formas de realização, o transplante é um transplante de medula óssea. Em formas de realização específicas, o receptor de transplante tem, está sentindo um sintoma de ou está em risco de desenvolver, doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD). [0051] Em uma forma de realização, o método de tratamento compreende avaliar um indivíduo quanto a um ou mais parâmetros de função pulmonar antes de um transplante, por exemplo, um transplante de órgão ou transplante de medula óssea, e, se os ditos um ou mais parâmetros pioram depois do dito transplante, administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, em que os ditos parâmetros de função pulmonar são volume

respiratório forçado em um segundo ( $FEV_1$ ); capacidade vital de volume forçado (FVC);  $FEV_1/FVC$ ; fluxo expiratório de pico (PEF); fluxo expiratório forçado 25 % a 50 % ou 25 % a 75 % (fluxo médio de ar que sai do pulmão durante a porção intermediária da expiração); tempo expiratório forçado (FET); capacidade pulmonar total (TLC); capacidade de difusão, monóxido de carbono (DLCO); ou ventilação voluntária máxima. Em uma forma de realização mais específica, a dita administração resulta na melhora de um dos ditos parâmetros de função pulmonar (1) para 80 % ou mais dos valores esperados para um indivíduo da mesma altura e peso; ou (2) em pelo menos 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % ou 10 % ou mais.

Nas formas de realização preferidas, o método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, cultura meio condicionado pelas células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, em que a quantidade terapeuticamente eficaz é uma quantidade que resulta em uma melhora detectável em um ou mais sintomas ou demora do início de um ou mais sintomas, da doença, distúrbio ou condição do pulmão associados com ou causados por ou associado com transplante ou GVHD. Em certas formas de realização, a dita administração resulta em pelo menos estabilização de um ou mais sintomas de GVHD; isto é, o dito um ou mais sintomas não melhoram significativamente, mas também não pioram significativamente. Em formas de realização mais específicas, o dito um ou mais sintomas de GVHD compreendem doença pulmonar obstrutiva (incluindo qualquer um de dispnéia ruidosa e/ou tosse crônica).

Em certas formas de realização, o método de tratamento compreende uma avaliação da eficácia da administração das células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias. Por exemplo, em uma forma de realização, o método de tratar uma doença pulmonar ou distúrbio causados por ou associados com, um transplante ou GVHD compreende (1)

administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, meio de cultura condicionado pelas células placentárias ou células do cordão umbilical, por exemplo, meio de cultura condicionado pelas células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias; e (2) avaliar o indivíduo quanto a melhora detectável em um ou mais sintomas ou demora do início de um ou mais sintomas, da doença, distúrbio ou condição do pulmão associados com ou causados pela GVHD. Em certas formas de realização específicas, o dito método de tratar compreende uma segunda administração (ou adicional) de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, ao dito indivíduo, opcionalmente seguida por uma segunda avaliação (ou adicional) do indivíduo quanto à melhora detectável em um ou mais sintomas ou demora do início de um ou mais sintomas, da doença, distúrbio ou condição do pulmão associados com ou causados pela GVHD.

O método não é limitado pela natureza do doador ou receptor. O transplante pode cruzar linhagens de espécies. Nas formas de realização preferidas, o doador e receptor são da mesma espécie, por exemplo, são ambos seres humanos. O receptor de transplante pode ser total ou parcialmente alogênico ao doador. O transplante pode ser autólogo. Os receptores ou doadores de transplante podem ser menores do que cinco anos de idade, de 1 a 10 anos de idade, de 5 a 15 anos de idade, de 10 a 20 anos de idade, de 15 a 25 anos de idade, de 20 a 30 anos de idade, de 25 a 35 anos de idade, de 30 a 40 anos de idade, de 35 a 45 anos de idade, de 40 a 50 anos de idade, de 45 a 55 anos de idade, de 50 a 60 anos de idade, de 55 a 65 anos de idade, de 60 a 70 anos de idade ou de 70 anos de idade ou mais velho.

Os métodos aqui fornecidos podem ser usados para tratar uma ou mais manifestações pulmonares de GVHD em indivíduos que exibem sintomas indicativos de um grau ou estágio da doença como mostrado nas Tabelas 1 e 2, abaixo. GVHD é no geral graduada pela severidade dos

sintomas. Por exemplo, em uma forma de realização, os sintomas de GVHD são graduados, e GVHD é graduada de 0 (nenhuma GVHD) - IV (GVHD ameaçadora da vida) de acordo com pele, fígado, e/ou sintomas intestinais, como mostrado nas Tabelas 1 e 2.

5 Tabela 1. Estágio de Doença do Enxerto Versus Hospedeiro Aguda

| Estágio | Pele                                                       | Fígado (Nível de Bilirrubina, mg/dL) | Intestino                                         |
|---------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------|
| +       | Exantema maculopapular em < 25 % da superfície corporal    | 2 a 3                                | Diarréia de 500 a 1000 ml/d ou náusea persistente |
| ++      | Exantema maculopapular em 25 a 50 % da superfície corporal | 3 a 6                                | Diarréia de 1000 a 1500/d                         |
| +++     | Eritroderma generalizado                                   | 6 a 15                               | Diarréia >1500 ml/d                               |
| ++++    | Descamação e bolhas                                        | > 15                                 | Dor com ou sem obstrução intestinal               |

Tabela 2. Graduação de GVHD aguda

| Grau Global   | Estágio    |            |            |                        |
|---------------|------------|------------|------------|------------------------|
|               | Pele       | Fígado     | Intestino  | Deterioração Funcional |
| 0 (Nenhum)    | 0          | 0          | 0          | 0                      |
| I (Brando)    | + a ++     | 0          | 0          | 0                      |
| II (Moderado) | + a +++    | +          | +          | +                      |
| III (Grave)   | ++ a +++   | ++ a +++   | ++ a +++   | ++                     |
| IV (Letal)    | +++ a ++++ | +++ a ++++ | +++ a ++++ | +++                    |

Em formas de realização específicas, as células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, são administradas ao indivíduo dentro de 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 dia antes do transplante.

Em uma outra forma de realização específica, as células placentárias são administradas concorrentemente com o transplante. Em uma outra forma de realização específica, as células placentárias são administradas dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou 14 dias do transplante. A administração de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, pode ser realizada múltiplas vezes, por exemplo, múltiplas vezes antes, com ou depois de transplante ou qualquer combinação destes. Em uma outra forma de realização, as células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, são administradas em qualquer tempo após o transplante quando a doença do enxerto versus hospedeiro de Grau II ou pior é manifestada no indivíduo (receptor de transplante).

Em uma outra forma de realização do método, o indivíduo, por exemplo, receptor de transplante ou um indivíduo que receberá um transplante, é administrado com uma quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, e adicionalmente pelo menos um outro agente terapêutico. Em uma forma de realização específica, o agente terapêutico é globulina atimocítica, micofenolato mofetila, sirolimus, Campath-1H, fator de crescimento de queratinócito (KGF), ácido suberoilanolida hidroxâmico (SAHA), cortisona, hidrocortisona, predisona ou metilprednisona. Em uma outra forma de realização específica, o agente terapêutico é um agente imunossupressivo ou agente imunomodulatório. Os agentes imunossupressivos e agentes imunomodulatórios que podem ser usados como segundo agentes para tratar GVHD, por exemplo, para tratar uma manifestação de GVHD nos pulmões, incluem, mas não são limitadas a, metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, ciclosporina A, antibióticos macrolídeos (por exemplo, FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticosteróides, esteróides, micofenolato mofetila, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxiespergualina, brequinar, malononitrilo-amidas (por exemplo, leflunamida), moduladores do receptor

de célula T, e moduladores do receptor de citocina, miméticos de peptídeo, e anticorpos (por exemplo, humanos, humanizados, quiméricos, monoclonais, policlonais, fragmentos Fvs, ScFvs, Fab ou F(ab)<sub>2</sub> ou fragmentos de ligação de epítopo), moléculas de ácido nucléico (por exemplo, moléculas de ácido nucléico de anti-sentido e hélices triplas), moléculas pequenas, compostos orgânicos, e compostos inorgânicos. Em particular, os agentes imunomodulatórios incluem, mas não são limitados a, metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, citoxan, Imuran, ciclosporina A, minociclina, azatioprina, antibióticos (por exemplo, FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticosteróides, esteróides, micofenolato mofetila, rapamicina (sirolimus), mizoribina, deoxispergualina, brequinar, malononitriloamindas (por exemplo, leflunamida), moduladores do receptor de célula T, e moduladores do receptor de citocina. Os exemplos de moduladores do receptor de célula T incluem, mas não são limitadas a, anticorpos anti-receptor de célula T (por exemplo, anticorpos anti-CD4 (por exemplo, cM-T412 (Boehringer), IDEC-CE9.Is (IDEC e SKB), mAB 4162W94, ORTHOCLONE® e OKTcdr4a (Janssen-Cilag)), anticorpos anti-CD3 (por exemplo, NUVION® (Product Design Labs), OKT3 (Johnson & Johnson) ou Rituxan (IDEC)), anticorpos anti-CD5 (por exemplo, um imunoconjugado ligado a ricina anti-CD5), anticorpos anti-CD7 (por exemplo, CHH-380 (Novartis)), anticorpos anti-CD8, anticorpos monoclonais anti-ligando CD40 (por exemplo, IDEC-131 (IDEC)), anticorpos anti-CD52 (por exemplo, CAMPATH® 1H (Ilex)), anticorpos anti-CD2, anticorpos anti-CD1a (por exemplo, Xanelim (Genentech)), e anticorpos anti-B7 (por exemplo, IDEC-114) (IDEC))), CTLA4-imunoglobulina, talidomida ou um dos compostos na Seção 5.6.6, acima. Em uma forma de realização específica, um modulador do receptor de célula T é um antagonista de CD2. Em outras formas de realização, um modulador do receptor de célula T não é um antagonista de CD2. Em uma outra forma de realização específica, o agente é

o anticorpo MEDI-501 (T10B9). Em uma outra forma de realização específica, um modulador do receptor de célula T é uma molécula de ligação de CD2, preferivelmente MEDI-507. Em outras formas de realização, um modulador do receptor de célula T não é uma molécula de ligação de CD2.

- 5 Qualquer combinação dos agentes terapêuticos acima, adequados para o tratamento de GVHD ou um sintoma de GVHD, pode ser administrada ao indivíduo. Tais agentes terapêuticos podem ser administrados em qualquer combinação com as células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, meio de cultura condicionado pelas células placentárias, células
- 10 do cordão umbilical, por exemplo, células tronco do cordão umbilical, e/ou meio de cultura condicionado por células do cordão umbilical, ao mesmo tempo ou como um curso separado de tratamento.

#### 4.1.3.2 Distúrbios Pulmonares Associado com Artrite Reumatóide

- Em uma outra forma de realização, é aqui fornecido um
- 15 método de tratar um indivíduo que tem ou está sentindo um sintoma de ou está em risco for desenvolver, uma doença, distúrbio ou condição do pulmão associados com ou causados pela artrite reumatóide (RA), que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias ou meio de cultura
- 20 condicionado pelas células placentárias, em que a dita quantidade terapeuticamente eficaz é uma quantidade que resulta em uma melhora detectável em um ou mais sintomas ou demora do início de um ou mais sintomas, da doença, distúrbio ou condição do pulmão associados com ou causados pela RA. Em certas formas de realização, a dita administração
- 25 resulta pelo menos na estabilização de um ou mais sintomas de RA que se manifestam em um pulmão do indivíduo; isto é, o dito um ou mais sintomas não melhoram significativamente, mas também não pioram significativamente.

Em certas formas de realização, o método de tratamento compreende identificar, em um indivíduo tendo RA, um sintoma da dita RA

no pulmão; administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, ao dito indivíduo, por exemplo, ao pulmão afetado do dito indivíduo; e avaliar o dito indivíduo quanto à melhora em um ou mais parâmetros de função pulmonar depois da dita administração (por exemplo, de 7 dias a 30 dias depois), em que os ditos parâmetros de função pulmonar são volume respiratório forçado em um segundo (FEV<sub>1</sub>); capacidade vital de volume forçado (FVC); FEV<sub>1</sub>/FVC; fluxo expiratório de pico (PEF); fluxo expiratório forçado 25 % a 50 % ou 25 % a 75 % (fluxo médio de ar que sai do pulmão durante a porção intermediária da expiração); tempo expiratório forçado (FET); capacidade pulmonar total (TLC); capacidade de difusão, monóxido de carbono (DLCO); ou ventilação voluntária máxima. Em uma forma de realização mais específica, a dita administração resulta em melhora de um dos ditos parâmetros de função pulmonar (1) para 80 % ou mais do esperado; ou (2) em pelo menos 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 50 %. Em uma forma de realização mais específica, o método compreende identificar qualquer um dos ditos parâmetros que, antes da administração, são menores do que 80 % dos valores esperados para um indivíduo da mesma altura e peso, e avaliar os ditos parâmetros depois da dita administração, em que a dita administração resulta na melhora de um dos ditos parâmetros de função pulmonar (1) para 80 % ou mais do esperado; ou (2) em pelo menos 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 50 %.

Em uma forma de realização específica, a administração é suficiente para causar uma melhora detectável em um ou mais sintomas da RA ou condição subordinada à RA ou suficiente para detectavelmente reduzir o início de um ou mais sintomas de RA ou condição subordinada ao RA, em um pulmão no indivíduo, por exemplo, respiração dolorosa, falta de ar (por exemplo, devido à efusão pleural), desenvolvimento ou presença de nódulos pulmonares (nódulos reumatóides), formação de cicatriz no pulmão (fibrose

pulmonar ou bronquiolite obliterativa), infecção viral do pulmão, fibrose dos pulmões (por exemplo, como uma consequência de terapia com metotrexato).

Em certas formas de realização, o método de tratamento compreende uma avaliação de eficácia da administração das células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias. Por exemplo, em uma  
5 forma de realização, o método de tratar uma doença pulmonar ou distúrbio causado pela ou associado com a RA compreende (1) administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, e/ou meio de cultura condicionado pelas células  
10 placentárias; e (2) avaliar o indivíduo quanto a melhora detectável em um ou mais sintomas ou demora do início de um ou mais sintomas, da doença, distúrbio ou condição do pulmão associados com ou causado pela RA. Em certas formas de realização específicas, o dito método de tratar compreende uma segunda administração (ou adicional) de células placentárias, por  
15 exemplo, células tronco placentárias, ao dito indivíduo, opcionalmente seguida por uma segunda avaliação (ou adicional) do indivíduo quanto a melhora detectável em um ou mais sintomas ou demora do início de um ou mais sintomas da doença, distúrbio ou condição do pulmão associados com ou causados pela RA.

20 Em uma forma de realização específica do método, o indivíduo tendo uma doença, distúrbio ou condição do pulmão associados com RA é administrado com uma quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias ou meio de cultura condicionado pelas células placentárias, e adicionalmente pelo menos  
25 um outro agente terapêutico, por exemplo, um analgésico ou um agente antiinflamatório. Em formas de realização mais específicas, o pelo menos um outro agente terapêutico é um medicamento anti-reumático modificador de doença (DMARD), por exemplo, um xenobiótico (por exemplo, azatioprina, ciclosporina A, D-penicilamina, sais de ouro, hidroxiclороquina, leflunomida,

metotrexato, minociclina ou sulfasalazina) ou um agente biológico (por exemplo, bloqueadores do fator alfa de necrose de tumor (TNF- $\alpha$ ), tal como etanercept (ENBREL®), infliximab (REMICADE®), adalimumab (HUMIRA®); bloqueadores de interleucina-1; anticorpo anti-célula B (CD20) (por exemplo, rituximab ou RITUXAN®); ou bloqueadores da ativação de célula T (por exemplo, abatacept ou ORENCIA®). Em uma outra forma de realização mais específica, o analgésico ou agente antiinflamatório é um glicocorticóide, um medicamento antiinflamatório não esteroide, acetaminofeno, ibuprofeno, aspirina, um opiato ou lidocaína (tópica). Tais agentes terapêuticos podem ser administrados em qualquer combinação com as células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, ao mesmo tempo ou como um curso separado de tratamento.

Em uma forma de realização específica, uma pluralidade das células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, administradas a um indivíduo tendo RA, são geneticamente engendradas para expressar um polipeptídeo terapêutico para RA. Em uma forma de realização mais específica, o polipeptídeo terapêutico para RA é IL-1Ra (antagonista do receptor de interleucina-1). Em uma outra forma de realização mais específica, o polipeptídeo terapêutico para RA é uma proteína de fusão que compreende IL-1Ra e DHFR (diidrofoliato redutase). Em uma forma de realização mais específica, as células placentárias são transformadas com um ácido nucléico que codifica a proteína de fusão de IL-1Ra-DHFR, em que a expressão da proteína de fusão é realçada por um antifoliatto, por exemplo, metotrexato. Em uma forma de realização ainda mais específica, o ácido nucléico codifica IL-1Ra-DHFR-IRES-Luc, onde IRES é um sítio de entrada de ribossoma interno, e Luc é luciferase. Em uma outra forma de realização específica, o dito ácido nucléico compreende uma sequência de nucleotídeo que permite o controle de expressão da IL-1Ra ou polipeptídeo de fusão IL-1Ra-DHFR.

#### 4.1.3.3 Distúrbios Pulmonares Associados com Lupo Eritematoso

Em uma outra forma de realização, é aqui fornecido um método de tratar um indivíduo que tem ou está sentindo um sintoma de, uma doença, distúrbio ou condição do pulmão associados com ou causados pelo lupo eritematoso (LE), que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias ou meio de cultura condicionado pelas células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, em que a dita quantidade terapeuticamente eficaz é uma quantidade que resulta em uma melhora detectável em um ou mais sintomas ou demora do início de um ou mais sintomas, da doença, distúrbio ou condição do pulmão associados com ou causados pelo LE. Em certas formas de realização, a dita administração resulta em pelo menos estabilização de um ou mais sintomas de LE que se manifestam em um pulmão do indivíduo; isto é, o dito um ou mais sintomas não melhoram significativamente, mas também não pioram significativamente. Em formas de realização específicas, os ditos sintomas compreendem pleurite (com ou sem efusão), pneumonite de lupo ou doença pulmonar intersticial difusa crônica.

Em certas formas de realização, o método de tratamento compreende identificar, em um indivíduo tendo LE, um sintoma do dito LE no pulmão; administrar células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, ao dito indivíduo, por exemplo, ao pulmão afetado do dito indivíduo; e avaliar o dito indivíduo quanto a melhora em um ou mais parâmetros de função pulmonar depois da dita administração (por exemplo, de 7 dias a 30 dias depois), em que os ditos parâmetros de função pulmonar são volume respiratório forçado em um segundo ( $FEV_1$ ); capacidade vital de volume forçado (FVC);  $FEV_1/FVC$ ; fluxo expiratório de pico (PEF); fluxo expiratório forçado 25 % a 50 % ou 25 % a 75 % (fluxo médio de ar que sai do pulmão durante a porção intermediária da expiração); tempo expiratório

forçado (FET); capacidade pulmonar total (TLC); capacidade de difusão, monóxido de carbono (DLCO); ou ventilação voluntária máxima. Em uma forma de realização mais específica, a dita administração resulta em melhora de um ou mais dos ditos parâmetros de função pulmonar (1) para 80 % ou mais do esperado; ou (2) em pelo menos 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 50 %. Em uma forma de realização mais específica, o método compreende identificar qualquer um dos ditos parâmetros que, antes da administração, são menores do que 80 % dos valores esperados para um indivíduo da mesma altura e peso, e avaliar os ditos parâmetros depois da dita administração, em que a dita administração resulta na melhora de um ou mais dos ditos parâmetros de função pulmonar (1) para 80 % ou mais do esperado; ou (2) em pelo menos 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 50 %.

Em certas formas de realização, o método de tratamento compreende uma avaliação de eficácia da administração das células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias. Por exemplo, em uma forma de realização, o método de tratar uma doença pulmonar ou distúrbio causado pelo ou associado com o LE compreende (1) administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias ou meio de cultura condicionado pelas células placentárias; e (2) avaliar o indivíduo quanto a melhora detectável em um ou mais sintomas ou demora do início de um ou mais sintomas da doença, distúrbio ou condição do pulmão associados com ou causados pelo LE. Em certas formas de realização específicas, o dito método de tratar compreende uma segunda administração (ou adicional) de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, ao dito indivíduo, opcionalmente seguida por uma segunda avaliação (ou adicional) do indivíduo quanto à melhora detectável em um ou mais sintomas ou demora do início de um ou mais sintomas da doença, distúrbio ou condição do pulmão associados com ou causados pelo LE.

#### 4.1.3.4 Distúrbios Pulmonares Associados com Escleroderma

Em uma outra forma de realização, é aqui fornecido um método de tratar um indivíduo que tem ou está sentindo um sintoma de uma doença, distúrbio ou condição do pulmão associados com ou causados pelo escleroderma, que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias ou meio de cultura condicionado pelas células placentárias, em que a dita quantidade terapêuticamente eficaz é uma quantidade que resulta em uma melhora detectável em um ou mais sintomas ou demora do início de um ou mais sintomas, da doença, distúrbio ou condição do pulmão associados com ou causados pelo escleroderma. Em certas formas de realização, a dita administração resulta em pelo menos estabilização de um ou mais sintomas de escleroderma que se manifestam em um pulmão do indivíduo; isto é, o dito um ou mais sintomas não melhoram significativamente, mas também não pioram significativamente. Em formas de realização específicas, os ditos sintomas compreendem dispnéia (falta de ar), doença pulmonar intersticial (também aludida como alveolite fibrosante ou fibrose pulmonar) ou doença vascular pulmonar (sozinha ou incluindo hipertensão pulmonar).

Em certas formas de realização, o método de tratamento compreende identificar, em um indivíduo tendo escleroderma, um sintoma do dito escleroderma no pulmão; administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, ao dito indivíduo, por exemplo, ao pulmão afetado do dito indivíduo; e avaliar o dito indivíduo quanto à melhora em um ou mais parâmetros de função pulmonar depois da dita administração (por exemplo, de 7 dias a 30 dias depois), em que os ditos parâmetros de função pulmonar são volume respiratório forçado em um segundo (FEV<sub>1</sub>); capacidade vital de volume forçado (FVC); FEV<sub>1</sub>/ FVC; fluxo expiratório de pico (PEF); fluxo expiratório forçado 25 % a 50 % ou 25 % a 75 % (fluxo médio de ar que sai

do pulmão durante a porção intermediária da expiração); tempo expiratório forçado (FET); capacidade pulmonar total (TLC); capacidade de difusão, monóxido de carbono (DLCO); ou ventilação voluntária máxima. Em uma forma de realização mais específica, a dita administração resulta em melhora de um dos ditos parâmetros de função pulmonar (1) para 80 % ou mais do esperado; ou (2) em pelo menos 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 50 %. Em uma forma de realização mais específica, o método compreende identificar qualquer um dos ditos parâmetros que, antes da administração, são menores do que 80 % dos valores esperados para um indivíduo da mesma altura e peso, e avaliar os ditos parâmetros depois da dita administração, em que a dita administração resulta na melhora de um dos ditos parâmetros de função pulmonar (1) para 80 % ou mais do esperado; ou (2) em pelo menos 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 50 %.

Em certas formas de realização, o método de tratamento compreende uma avaliação de eficácia da administração das células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias. Por exemplo, em uma forma de realização, o método de tratar uma doença pulmonar ou distúrbio causado pelo ou associado com o escleroderma compreende (1) administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias ou células do cordão umbilical, por exemplo, células tronco placentárias ou meio de cultura condicionado pelas células placentárias; e (2) avaliar o indivíduo quanto à melhora detectável em um ou mais sintomas ou demora do início de um ou mais sintomas, da doença, distúrbio ou condição do pulmão associados com ou causados pelo escleroderma. Em certas formas de realização específicas, o dito método de tratar compreende uma segunda administração (ou adicional) de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, ao dito indivíduo, opcionalmente seguida por uma segunda avaliação (ou adicional) do indivíduo quanto à melhora detectável em um ou mais sintomas ou demora do início de um ou mais sintomas, da doença, distúrbio ou condição do

pulmão associados com ou causados pelo escleroderma.

Em uma forma de realização específica, o dito indivíduo é avaliado quanto à capacidade de difusão para monóxido de carbono (DLCO), e a melhora no indivíduo compreende uma melhora significativa na DLCO  
5 depois da administração de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, (por exemplo, um aumento de pelo menos 3, 4, 5 ou mais pontos percentuais) comparados com DLCO antes da administração. Em uma outra forma de realização específica, o dito indivíduo é avaliado quanto à capacidade vital forçada (FVC), e a melhora no indivíduo compreende um  
10 aumento na FVC de pelo menos 10 % pelo menos 15 % ou pelo menos 20 % depois de administração das células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, comparados com a FVC antes da administração, por exemplo para um período de pelo menos 1, 2, 3 ou 4 semanas ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 meses depois da administração.

15 Em uma outra forma de realização específica, o indivíduo é avaliado quanto à formação de cicatriz no pulmão ou hipertensão pulmonar usando, por exemplo, varredura de CT de alta resolução dos pulmões, lavagem broncoalveolar, e/ou biópsia cirúrgica pulmonar.

Em uma forma de realização específica do método, o  
20 indivíduo tendo uma doença, distúrbio ou condição do pulmão associados com RA é administrado com células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias ou meio de cultura condicionado pelas células placentárias, e adicionalmente pelo menos um outro agente terapêutico. Em formas de realização mais específicas, o agente terapêutico compreende, sem limitação,  
25 um inibidor da síntese de colágeno e/ou reticulação de colágeno (por exemplo, penicilamina), um esteróide (por exemplo, prednisona), ciclofosfamida (por exemplo, CITOXAN®), uma combinação de ciclofosfamida e um esteróide, uma combinação de ciclofosfamida e azatioprina, um antifibrótico (por exemplo, interferon-gama (IFN- $\gamma$ )), um

antiendotelina (por exemplo, Bosentan (TRACLEER®)), um análogo de prostaciclina (por exemplo, epoprostenol (FLOLAN®), treprostinila (REMODULIN®)), e/ou um antagonista do receptor de endotelina (por exemplo, receptor de endotelina B) (por exemplo, sitaxentan, ambrisentan (LETAIRIS®)).

#### 4.1.3.5 Determinação do Potencial Imunossupressivo das Células Placentárias

Em certas formas de realização opcionais, a capacidade de uma população particular de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, para a imunossupressão é determinada antes do uso, por exemplo, antes da administração a um indivíduo tendo uma doença, distúrbio ou condição do pulmão associados com ou causados por uma resposta imune inadequada ou indesejada. Por exemplo, a MLR pode ser usada para determinar a capacidade imunossupressiva de uma população particular de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, por exemplo, uma dose particular de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias. Procedimentos para realizar a MLR e ensaios de regressão são bem conhecidos na técnica. Ver, por exemplo Schwarz, "A Mixed Lymphocyte Reaction: A In vitro Test for Tolerance," J. Exp. Med. 127(5): 879-890 (1968); Lacerda et al., "Human Epstein-Barr Virus (EBV)-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Home Preferentially to and Induce Selective Regressions of Autologous EBV-Induced B Lymphoproliferations in Xenografted CB-17 Scid/Scid Mice," J. Exp. Med. 183: 1215-1228 (1996). Em uma forma de realização preferida, uma MLR é realizada em que uma pluralidade de células tronco placentárias são contatadas com uma pluralidade de células imunes (por exemplo, linfócitos, por exemplo, linfócitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e/ou CD8<sup>+</sup>). Por exemplo, uma pluralidade de células placentárias pode ser testada em uma MLR que compreende combinar células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, células dendríticas (DC) e células placentárias em uma razão de cerca de 10:1:2, em que as células T são tingidas com um corante tal como, por

exemplo, CFSE que divide em células filhas, e em que as células T são permitidas proliferar por cerca de 6 dias. A pluralidade de células placentárias é imunossupressiva se a proliferação de célula T em 6 dias na presença de células placentárias é detectavelmente reduzida comparada com a proliferação de célula T na presença de DC e ausência de células placentárias. Em uma tal MLR, as células placentárias são descongeladas ou colhidas da cultura. Em torno de 20.000 células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, são recolocadas em suspensão em 100 µl de meio (RPMI 1640, 1 mM de tampão HEPES, antibióticos, e 5 % de soro humano reunido), e permitido ligar ao fundo de um reservatório por 2 horas. As células T CD4<sup>+</sup> e/ou CD8<sup>+</sup> são isoladas de células mononucleares de sangue periférico integral usando pérolas magnéticas Miltenyi. As células são tingidas com CFSE, e um total de 100.000 células T (células T CD4<sup>+</sup> sozinhas, células T CD8<sup>+</sup> sozinhas ou quantidades iguais de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) são adicionadas por reservatório. O volume no reservatório é levado a 200 µl, e a MLR é deixada processar.

#### 4.1.4 Tratamento de Outras Doenças ou Distúrbios Pulmonares

Também são aqui fornecidos métodos de tratar doenças, distúrbios ou condições pulmonares que surgem de outras causas, que compreendem administrar a um indivíduo tendo a dita doença, distúrbio ou condição, por exemplo, a um pulmão afetado do dito indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias. Por exemplo, em certas formas de realização, é aqui fornecido um método de tratar um indivíduo tendo uma doença, distúrbio ou condição que afeta os pulmões, em que a dita doença, distúrbio ou condição do pulmão é uma lesão pulmonar aguda. Em formas de realização específicas, a dita lesão pulmonar aguda é um ou mais de trauma físico, lesão devido a medicamento ou toxicidade quimioterapêutica (por exemplo, toxicidade devida a tratamento com bleomicina, ciclofosfamida,

nitrofurantoína, metotrexato, combinação de 5-fluorouracila e terapia com oxaliplatina ou semelhante), uma lesão induzida por radiação, uma lesão química, por exemplo, uma queimadura química, inalação de fumaça, exposição a uma substância tóxica ou pneumonia quimicamente induzida.

5                   Em certas outras formas de realização, a dita doença, distúrbio ou condição pulmonares é uma lesão causada por uma doença neoplástica ou paraneoplástica.

10                   Ainda em outras formas de realização, a doença, distúrbio ou condição que afeta o pulmão é uma infecção viral ou bacteriana do pulmão (por exemplo, pneumonia), uma doença pulmonar infecciosa ou fibrose cística.

15                   Em formas de realização específicas, a doença, distúrbio ou condição do pulmão é uma doença pulmonar ambiental, uma doença granulomatosa, uma doença obstrutiva, uma doença vascular, um neoplasmo ou um distúrbio pleural.

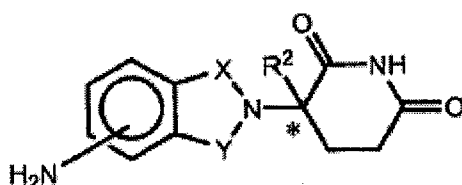
#### 4.1.5 Composições Terapêuticas Secundárias e Terapias Secundárias

20                   Em qualquer um dos métodos de tratamento acima, o método pode compreender a administração de uma composição terapêutica secundária ou terapia secundária. As composições terapêuticas secundárias ou terapias secundárias pode consistir de ou compreender, as composições terapêuticas secundárias ou terapias secundárias específicas listadas acima para as doenças, distúrbios ou condições relacionadas com o pulmão debatidas nas Seções 4.1.2 a 4.1.4, acima. Entretanto, a recitação de compostos terapêuticos secundários ou terapias secundárias específicos nos métodos de tratar doenças  
25                   específicas, acima, não são intencionadas a serem exclusivas. Por exemplo, qualquer uma das doenças, distúrbios ou condições aqui debatidas podem ser tratadas com qualquer um dos compostos anti-inflamatórios ou compostos imunossupressivos aqui descritos.

Nas formas de realização em que as células placentárias, por

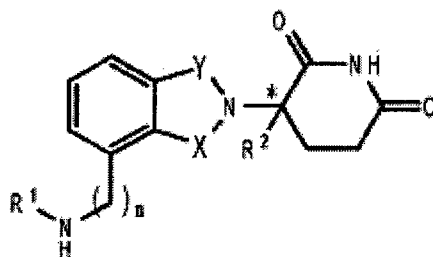
exemplo, células tronco placentárias, são administradas com um segundo agente terapêutico, por exemplo, um segundo tipo de célula, as células placentárias e agentes terapêuticos secundários podem ser administrados ao mesmo tempo ou em tempos diferentes, por exemplo, as administrações podem ocorrer dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10, 20, 30, 40 ou 50 minutos uma da outra ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ou 22 horas uma da outra ou dentro 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 8, 9 ou 10 dias uma da outra.

Em um exemplo, a terapia secundária compreende um imunomodulatório é



em que um de X e Y é C=O, o outro de X e Y é C=O ou CH<sub>2</sub>, e R<sup>2</sup> é hidrogênio ou alquila inferior ou um sal, hidrato, solvato, clatrato, enantiômero, diastere

farmaceuticamente a específica, o dito c estrutura



em que um de X e Y é C=O e o outro é CH<sub>2</sub> ou C=O;

R<sup>1</sup> é H, alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalquila (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), alquenila (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), alquinila (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), benzila, arila, alquila (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heterocicloalquila (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquila (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heteroarila (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>), C(O)R<sup>3</sup>, C(S)R<sup>3</sup>, C(O)OR<sup>4</sup>, alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>, alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-OR<sup>5</sup>, alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-C(O)OR<sup>5</sup>, C(O)NHR<sup>3</sup>, C(S)NHR<sup>3</sup>, C(O)NR<sup>3</sup>R<sup>3'</sup>, C(S)NR<sup>3</sup>R<sup>3'</sup> ou alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-O(CO)R<sup>5</sup>;

R<sup>2</sup> é H, F, benzila, alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), alquenila (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) ou alquinila (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>);

R<sup>3</sup> e R<sup>3'</sup> são independentemente alquila (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalquila (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), alquenila (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), alquinila (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), benzila, arila, alquila (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heterocicloalquila (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquila (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heteroarila (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>), alquila (C<sub>0</sub>-

$C_8$ )- $N(R^6)_2$ , alquila ( $C_1$ - $C_8$ )- $OR^5$ , alquila ( $C_1$ - $C_8$ )- $C(O)OR^5$ , alquila ( $C_1$ - $C_8$ )- $O(CO)R^5$  ou  $C(O)OR^5$ ;

$R^4$  é alquila ( $C_1$ - $C_8$ ), alquenila ( $C_2$ - $C_8$ ), alquinila ( $C_2$ - $C_8$ ), alquila ( $C_1$ - $C_4$ )- $OR^5$ , benzila, arila, alquila ( $C_0$ - $C_4$ )-heterocicloalquila ( $C_1$ - $C_6$ ) ou alquila ( $C_0$ - $C_4$ )-heteroarila ( $C_2$ - $C_5$ );

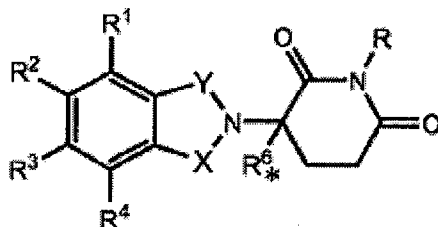
$R^5$  é alquila ( $C_1$ - $C_8$ ), alquenila ( $C_2$ - $C_8$ ), alquinila ( $C_2$ - $C_8$ ), benzila, arila ou heteroarila ( $C_2$ - $C_5$ );

cada ocorrência de  $R^6$  é independentemente H, alquila ( $C_1$ - $C_8$ ), alquenila ( $C_2$ - $C_8$ ), alquinila ( $C_2$ - $C_8$ ), benzila, arila, heteroarila ( $C_2$ - $C_5$ ) ou alquila ( $C_0$ - $C_8$ )- $C(O)O-R^5$  ou os grupos  $R^6$  podem se unir para formar um grupo heterocicloalquila;

$n$  é 0 ou 1; e

\* representa um centro de carbono quiral;

ou um sal, hidrato, solvato, clatrato, enantiômero, diastereômero, racemato ou mistura de estereoisômeros destes farmaceuticamente aceitáveis, a de realização mais específica, o dito composto tendo a estrutura



em que:

um de  $X$  e  $Y$  é  $C=O$  e o outro é  $CH_2$  ou  $C=O$ ;

$R$  é H ou  $CH_2OCOR'$ ;

(i) cada um de  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  ou  $R^4$ , independentemente dos outros, é halo, alquila de 1 a 4 átomos de carbono ou alcóxi de 1 a 4 átomos de carbono ou (ii) um de  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  ou  $R^4$  é nitro ou  $-NHR^5$  e o resto de  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  ou  $R^4$  é hidrogênio;

$R^5$  é hidrogênio ou alquila de 1 a 8 carbonos

$R^6$  hidrogênio, alquila de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro ou flúor;

$R'$  é  $R^7\text{-CHR}^{10}\text{-N(R}^8\text{R}^9)$ ;

$R^7$  é m-fenileno ou p-fenileno ou  $-(C_nH_{2n})-$  em que n tem um valor de 0 a 4;

5 cada um de  $R^8$  e  $R^9$  considerados independentemente um do outro é hidrogênio ou alquila de 1 a 8 átomos de carbono ou  $R^8$  e  $R^9$  considerados juntos são tetrametileno, pentametileno, hexametileno ou  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}_1\text{CH}_2\text{CH}_2-$  em que  $X_1$  é  $-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-$  ou  $-\text{NH}-$ ;

$R^m$  é hidrogênio, alquila de a 8 átomos de carbono ou fenila; e

\* representa um centro de carbono quiral;

10 ou um sal, hidrato, solvato, clatrato, enantiômero, diastereômero, racemato ou mistura de estereoisômeros destes farmaceuticamente aceitáveis.

Em formas de realização mais específicas, o composto imunomodulatório é 3-(4-amino-1-oxo-1,3-diidroisoindol-2-il)-piperidino-  
15 2,6-diona (lanalidomida); 3-(4'-aminoisolindolino-1'-ona)-1-piperidino-2,6-diona;  
4-(Amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolino-1,3-diona (pomalidomida); ou  $\alpha$ -(3-aminoftalimido) glutarimida (lenalidomida).

As células tronco placentárias podem ser administradas a um indivíduo que sofre de uma doença, distúrbio ou condição do pulmão na  
20 forma de uma composição farmacêutica, por exemplo, uma composição farmacêutica adequada para a injeção intravenosa, intramuscular ou intraperitoneal. As células tronco placentárias podem ser administradas em uma dose única ou em doses múltiplas. Onde células tronco placentárias são administradas em doses múltiplas, as doses podem ser parte de um regime  
25 terapêutico planejado para aliviar um ou mais sintomas agudos de uma doença pulmonar, condição ou distúrbio ou podem ser parte de um regime terapêutico de longa duração planejado para prevenir ou diminuir a severidade, de um curso crônico da doença. Nas formas de realização em que as células tronco placentárias são administradas com um agente terapêutico

secundário ou com um tipo secundário de célula, as células tronco placentárias e agentes terapêuticos secundários e/ou tipo secundário de célula tronco podem ser administrados ao mesmo tempo ou tempos diferentes, por exemplo, as administrações podem ocorrer dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10, 20, 30, 40 ou 50 minutos uma da outra ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ou 22 horas uma da outra ou dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 8, 9 ou 10 dias uma da outra.

#### 4.1.6 Administração de Células Placentárias

A administração das células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, pode ser por qualquer via medicamente aceitável. Em formas de realização específicas, as células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, são administradas intravenosa, intra-arterial, parenteral, subcutânea, intramuscular, intraperitonealmente ou semelhante. As células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, podem ser administradas sistêmica ou diretamente a uma área afetada do pulmão. Em certas formas de realização, as células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, são administradas ao indivíduo pela inalação, por exemplo, em uma pulverização, aerossol, pela ventilação externa ou mecânica ou pela aplicação direta (por exemplo, injeção ou aplicação tópica) a uma parte do pulmão, por exemplo, traquéia, brônquio, bronquíolo, lóbulo, alvéolo ou semelhante.

Para a administração in vivo, as células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, podem ser formuladas como uma composição farmacêutica, como descrito abaixo.

Em uma forma de realização, o indivíduo é administrado com uma dose de cerca de 200 milhões de células placentárias. A dosagem, entretanto, pode variar de acordo com as características físicas do indivíduo, por exemplo, peso, e pode variar de 1 milhão a 10 bilhões de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, por dose,

preferivelmente entre 10 milhões e 1 bilhão por dose ou entre 100 milhões e 50 milhões de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, por dose.

A administração durante um curso de tratamento de um indivíduo tendo uma doença, distúrbio ou condição do pulmão pode compreender uma única administração de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias ou administrações múltiplas de células placentárias. Se mais do que uma administração de células placentárias é usada no curso de tratamento, o indivíduo pode ser administrado com o mesmo número aproximado de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, por administração ou pode ser administrado com números diferentes de células placentárias. Por exemplo, em uma forma de realização, um indivíduo que sofre de uma doença, distúrbio ou condição do pulmão é administrado com uma dose inicial, relativamente grande de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, enquanto que as administrações subsequentes compreendem a administração de um número relativamente menor de células placentárias, por exemplo, cerca de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % ou 95 % do número de células na dose inicial.

## 4.2 CÉLULAS PLACENTÁRIAS E POPULAÇÕES DE CÉLULA PLACENTÁRIA

Os métodos de tratamento de doenças, distúrbios ou condições do pulmão, aqui fornecidos compreendem a administração de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, a um indivíduo tendo a doença, distúrbio ou condição. As células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, úteis nos métodos de tratamento aqui descritos, e os métodos de obter e cultivar tais células são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. N<sup>os</sup> 7.045.148; 7.255.879; 7.311.904; e 7.311.905; e nas Publicações de Pedido de Patente U.S. N<sup>os</sup> 2007/0275362 e 2008/0226595, as

divulgações de cada um dos quais são aqui incorporadas por referência em suas totalidades.

As células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, podem ser fetais ou maternas na origem (isto é, podem ter o genótipo da mãe ou feto). As populações de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias ou populações de células que compreendem células placentárias, podem compreender células placentárias que são apenas fetais ou maternas na origem ou podem compreender uma população misturada de células placentárias de origem tanto fetal quanto materna. As células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, e populações de células que compreendem as células placentárias, podem ser identificadas e selecionadas pelas características morfológicas, de marcador, e de cultura debatidas abaixo.

#### 4.2.1 Características Físicas e Morfológicas

As células, por exemplo, células tronco placentárias úteis nos métodos de tratar doenças, distúrbios ou condições pulmonares aqui divulgadas, quando cultivadas em culturas primárias ou em cultura de célula, aderem-se ao substrato de cultura de tecido, por exemplo, a superfície do recipiente de cultura de tecido (por exemplo, plástico de cultura de tecido). As células em cultura assumem no geral uma aparência fibroblastóide, semelhante a uma estrela, com vários processos citoplásmicos que se estendem do corpo celular central. As células são, entretanto, morfolologicamente diferenciáveis dos fibroblastos cultivados sob as mesmas condições. Por exemplo, as células no geral exibem um número maior de tais processos do que dos fibroblastos cultivados sob as mesmas condições. Morfolologicamente, as células também são distinguíveis das células tronco hematopoiéticas, que no geral assumem uma morfologia mais arredondada ou paralelepípedo, em cultura.

#### 4.2.2 Superfície Celular, Marcadores Moleculares e Genéticos

As células placentárias isoladas, por exemplo, células tronco placentárias, e populações de célula tronco placentárias isoladas, úteis nos métodos de tratamento aqui divulgados, são células placentárias ou células do cordão umbilical humanas aderentes ao plástico de cultura de tecido que têm

5 características de células multipotentes ou células tronco, e expressam uma pluralidade de marcadores que podem ser usados para identificar e/ou isolar as células ou populações de células que compreendem as células tronco. As células tronco placentárias isoladas, e as populações de célula que compreendem as células tronco placentárias (isto é, duas ou mais célula

10 isoladas), aqui descritas, incluem células e populações de célula contendo célula obtidas diretamente da placenta ou qualquer parte desta (por exemplo, âmnio, córion, cotilédones placentários, e outros) ou cordão umbilical. As populações de célula tronco placentária isoladas também incluem populações de (isto é, duas ou mais) células tronco placentárias isoladas em cultura, e

15 uma população em um recipiente, por exemplo, uma bolsa.

As células tronco placentárias isoladas aqui descritas não são células mesenquimatosas derivadas da medula óssea, células tronco mesenquimatosas derivadas de tecido adiposo ou células mesenquimatosas obtidas do sangue do cordão umbilical, sangue placentário ou sangue

20 periférico. Como aqui usado, o termo “células tronco placentárias” abrange qualquer uma das células tronco ou células multipotentes descritas nesta seção. As células tronco placentárias isoladas também não são trofoblastos. Trofoblastos em cultura tipicamente formam células multinucleadas chamadas de sinciciotrofoblastos; as células tronco placentárias, ao contrário,

25 não formam células multinucleadas em cultura, mas ao invés expandem-se como uma população de células uninucleares, similares à expansão de fibroblastos.

Em certas formas de realização, as células tronco placentárias são células tronco isoladas. Em certas outras formas de realização, as células

tronco placentárias são células multipotentes isoladas. Em uma forma de realização, as células isoladas são  $CD34^-$ ,  $CD10^+$  e  $CD105^+$  como detectadas pela citometria de fluxo. Em uma forma de realização específica, as células  $CD34^-$ ,  $CD10^+$ ,  $CD105^+$  isoladas são células tronco. Em uma outra forma de realização específica, as células  $CD34^-$ ,  $CD10^+$ ,  $CD105^+$  isoladas são células multipotentes. Em uma outra forma de realização específica, as células  $CD34^-$ ,  $CD10^+$ ,  $CD105^+$  isoladas têm o potencial para diferenciar em células de um fenótipo neural, as células de um fenótipo osteogênico, e/ou células de um fenótipo condrogênico. Em uma outra forma de realização específica, as células  $CD34^-$ ,  $CD10^+$ ,  $CD105^+$  isoladas são adicionalmente  $CD200^+$ . Em uma outra forma de realização específica, as células  $CD34^-$ ,  $CD10^+$ ,  $CD105^+$  isoladas são adicionalmente  $CD45^-$  ou  $CD90^+$ . Em uma outra forma de realização específica, as células  $CD34^-$ ,  $CD10^+$ ,  $CD105^+$  isoladas são adicionalmente  $CD45^-$  e  $CD90^+$ , como detectadas pela citometria de fluxo. Em uma forma de realização mais específica, as células  $CD34^-$ ,  $CD10^+$ ,  $CD105^+$ ,  $CD200^+$  isoladas são adicionalmente  $CD90^+$  ou  $CD45^-$ , como detectadas pela citometria de fluxo. Em uma outra forma de realização mais específica, as células  $CD34^-$ ,  $CD10^+$ ,  $CD105^+$ ,  $CD200^+$  isoladas são adicionalmente  $CD90^+$  e  $CD45^-$ , como detectadas pela citometria de fluxo, isto é, as células são  $CD34^-$ ,  $CD10^+$ ,  $CD45^-$ ,  $CD90^+$ ,  $CD105^+$  e  $CD200^+$ . Em uma forma de realização mais específica, as ditas células  $CD34^-$ ,  $CD10^+$ ,  $CD45^-$ ,  $CD90^+$ ,  $CD105^+$ ,  $CD200^+$  são adicionalmente  $CD80^-$  e  $CD86^-$ .

Em uma forma de realização específica, qualquer uma das células  $CD34^-$ ,  $CD10^+$ ,  $CD105^+$  descritas acima são adicionalmente um ou mais de  $CD29^+$ ,  $CD38^-$ ,  $CD44^+$ ,  $CD54^+$ ,  $SH3^+$  ou  $SH4^+$ . Em uma outra forma de realização mais específica, as células são adicionalmente  $CD44^+$ . Em uma outra forma de realização específica de qualquer uma das células  $CD34^-$ ,  $CD10^+$ ,  $CD105^+$  isoladas acima, as células são adicionalmente uma ou mais de  $CD117^-$ ,  $CD133^-$ ,  $KDR^-$  ( $VEGFR2^-$ ),  $HLA-A,B,C^+$ ,  $HLA-DP,DQ,DR^-$  ou

ligando da Morte Programada 1 (PDL1)<sup>+</sup> ou qualquer combinação destas.

Em uma outra forma de realização, as células CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> são adicionalmente uma ou mais de CD13<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD62E<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CD6213<sup>-</sup>, SH3<sup>+</sup> (CD73<sup>-</sup>), SH4<sup>+</sup> (CD73<sup>-</sup>), CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup> (CD105<sup>+</sup>), CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD11T, CD144NE-caderina<sup>baixo</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD133<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, ABC-p<sup>+</sup>, KDR<sup>-</sup> (VEGFR2<sup>-</sup>), HLA-A,B,C<sup>+</sup>, HLA-DP,DQ,DR<sup>-</sup>, HLA-G<sup>+</sup> ou Ligando da Morte Programada 1 (PDL1)<sup>+</sup> ou qualquer combinação deste. Em uma outra forma de realização, as células CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> são adicionalmente CD13<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54/ICAM<sup>+</sup>, CD62E<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CD62P<sup>-</sup>, SH3<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), SH4<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup> (CD105<sup>+</sup>), CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD117<sup>-</sup>, CD144V/E-caderina<sup>baixo</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD133<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, ABC-p<sup>+</sup>, KDR<sup>-</sup> (VEGFR2<sup>-</sup>), HLA-A,B,C<sup>+</sup>, HLA-DP,DQ,DR<sup>-</sup>, HLA-G<sup>+</sup>, e Ligando da Morte Programada 1 (PDL1)<sup>+</sup>. [0094] Em certas formas de realização, as células são uma ou mais de SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup> ou ABC-p<sup>+</sup>. As células isoladas também podem expressar HLA-ABC (MHC-1). Estes marcadores podem ser usados, em qualquer combinação, para identificar as células isoladas, por exemplo, células tronco isoladas ou células multipotentes isoladas e para distinguir as células isoladas de outros tipos de célula. A falta de expressão de CD34, CD38 e/ou CD45, por exemplo, identifica as células isoladas como não células tronco hematopoiéticas.

Também são aqui fornecidas populações das células isoladas ou populações de células, por exemplo, populações de células placentárias ou células do cordão umbilical, que compreendem, por exemplo, que são enriquecidas para, células tronco placentárias, que são úteis nos métodos de tratamento aqui divulgados. As populações de células preferidas que compreendem células tronco placentárias, em que as populações de células são úteis nos métodos de tratamento aqui divulgados, compreendem, por

exemplo, pelo menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 98 % de células tronco placentárias, por exemplo, células CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> e CD34<sup>-</sup> isoladas; isto é, pelo menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %  
5 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 98 % de células na dita população são células tronco placentárias, por exemplo, células CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> e CD34<sup>-</sup> isoladas. Em uma forma de realização específica, as células CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> isoladas são adicionalmente CD200<sup>+</sup>. Em uma forma de realização mais específica, as células CD34<sup>-</sup>,  
10 CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> isoladas são adicionalmente CD90<sup>+</sup> ou CD45<sup>-</sup>, como detectadas pela citometria de fluxo. Em uma outra forma de realização mais específica, as células CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> isolado são adicionalmente CD90<sup>+</sup> e CD45<sup>-</sup>, como detectadas pela citometria de fluxo. Em uma forma de realização mais específica, qualquer uma das células CD34<sup>-</sup>,  
15 CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> isoladas descritas acima são adicionalmente uma ou mais de CD29<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup> ou SH4<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização mais específica, as células CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> isoladas ou células CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> isoladas, são adicionalmente CD44<sup>+</sup>. Em uma forma de realização específica de qualquer uma das populações de  
20 células que compreendem células CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> isoladas acima, as células isoladas são adicionalmente uma ou mais de CD13<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD62E<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CD62P<sup>-</sup>, SH3<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), SH4<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup> (CD105<sup>+</sup>), CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD117<sup>-</sup>, CD144/VE-caderina<sup>baixo</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD133<sup>-</sup>, OCT-  
25 4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, ABC-p<sup>+</sup>, KDR<sup>-</sup> (VEGFR2<sup>-</sup>), HLA-A,B,C<sup>+</sup>, HLA-DP,DQ,DR<sup>-</sup>, HLA-G<sup>+</sup> ou Ligando da Morte Programada 1 (PDL1)<sup>+</sup> ou qualquer combinação destas. Em uma forma de realização mais específica, as células CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> isoladas são adicionalmente CD13<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54/ICAM<sup>+</sup>, CD62E<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CD62P<sup>-</sup>,

SH3<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), SH4<sup>+</sup> (CD73<sup>+</sup>), CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup> (CD105<sup>+</sup>),  
 CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD117<sup>-</sup>, CD144/VE-caderina<sup>baixo</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>,  
 CD200<sup>+</sup>, CD133<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, ABC-p<sup>+</sup>, KDR<sup>-</sup> (VEGFR2<sup>-</sup>),  
 HLA-A,B,C<sup>+</sup>, HLA-DP,DQ,DR<sup>-</sup>, HLA-G<sup>+</sup>, e Ligando da Morte Programada 1  
 5 (PDL1)<sup>+</sup>.

Em certas formas de realização, as células tronco placentárias  
 úteis nos métodos de tratamento aqui descritas são células isoladas que são  
 uma ou mais ou todas, de CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>,  
 CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup>, e ABC-p<sup>+</sup>, em  
 10 que as ditas células isoladas são obtidas pelo rompimento físico e/ou  
 enzimático de tecido placentário ou tecido de cordão umbilical. Em uma  
 forma de realização específica, as células isoladas são OCT-4<sup>+</sup> e ABC-p<sup>+</sup>. Em  
 uma outra forma de realização específica, as células isoladas são OCT-4<sup>+</sup> e  
 CD34<sup>-</sup>, em que a ditas células isoladas têm pelo menos uma das seguintes  
 15 características: CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>,  
 SSEA3<sup>-</sup>, e SSEA4<sup>-</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células  
 isoladas são OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>,  
 SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, e SSEA4<sup>-</sup>. Em uma outra forma de realização, as  
 células isoladas são OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, e SSEA4<sup>-</sup>. Em uma forma de  
 20 realização mais específica, as células isoladas são OCT-4<sup>+</sup> e CD34<sup>-</sup>, e SH2<sup>+</sup>  
 ou SH3<sup>+</sup>. Em uma forma de realização mais específica, as células isoladas são  
 OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, SH2<sup>+</sup>, e SH3<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização mais  
 específica, as células isoladas são OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, e SSEA4<sup>-</sup>, e são  
 SH2<sup>+</sup> ou SH3<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização mais específica, as células  
 25 isoladas são OCT-4<sup>+</sup> e CD34<sup>-</sup>, e SH2<sup>+</sup> ou SH3<sup>+</sup>, e pelo menos uma de CD10<sup>+</sup>,  
 CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup> ou SSEA4<sup>-</sup>. Em uma outra  
 forma de realização mais específica, as células isoladas são OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>,  
 CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, e SSEA4<sup>-</sup>, e tanto  
 SH2<sup>+</sup> ou SH3<sup>+</sup>.

Em uma outra forma de realização, as células tronco placentárias úteis nos métodos de tratamento aqui divulgados são células SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup> e OCT-4<sup>+</sup>. Em uma forma de realização mais específica, as células isoladas são CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, ou SSEA4<sup>-</sup>. Em uma outra forma de realização, as células isoladas são SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup> e SSEA4<sup>-</sup>. Em uma forma de realização mais específica, as células isoladas são SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup> e SSEA4<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> ou CD45<sup>-</sup>.

Em uma outra forma de realização, as células tronco placentárias úteis nos métodos aqui divulgados são CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup> e SH4<sup>+</sup>; em que as células são adicionalmente uma ou mais de OCT-4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup> ou SSEA4<sup>-</sup>. [0099]Em certas formas de realização, as células tronco placentárias úteis nos métodos de tratamento aqui divulgados são CD200<sup>+</sup> ou HLA-G<sup>+</sup>. Em uma forma de realização específica, as células são CD200<sup>+</sup> e HLA-G<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células são adicionalmente CD73<sup>+</sup> e CD105<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células são adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> ou CD45<sup>-</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células são adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> e CD45<sup>-</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células são CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup> e CD105<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células CD200<sup>+</sup> ou HLA-G<sup>+</sup> isoladas facilitam a formação de corpos como embrióides em uma população de células placentárias que compreende as células, sob condições que permitem a formação de corpos como embrióide. Em uma outra forma de realização específica, as células tronco placentárias são isoladas das células placentárias ou células do cordão umbilical que não são células tronco ou multipotentes. Em uma outra forma de realização específica, as células tronco placentárias são isoladas das células tronco placentárias que não demonstram os marcadores descritos acima.

Em uma outra forma de realização, uma população de célula útil nos métodos de tratamento aqui descritos é uma população isolada de células que compreende, por exemplo, isto é enriquecidas para, células tronco placentárias CD200<sup>+</sup>, HLAG<sup>+</sup>. Em uma forma de realização específica, a dita população é uma população de células placentárias. Em uma outra forma de realização específica, a dita população é uma população de células do cordão umbilical. Em várias formas de realização específicas, pelo menos cerca de 10 %, pelo menos cerca de 20 %, pelo menos cerca de 30 %, pelo menos cerca de 40 %, pelo menos cerca de 50 % ou pelo menos cerca de 60 % das células na dita população de célula são células CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> isoladas. Preferivelmente, pelo menos cerca de 70 % das células na dita população de célula são células CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> isoladas. Mais preferivelmente, pelo menos cerca de 80 %, 90 %, 95 % ou 99 % das ditas células são células CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> isoladas. Em uma forma de realização específica das populações de célula, as ditas células CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> isoladas também são CD73<sup>+</sup> e CD105<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> isoladas também são CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> ou CD45<sup>-</sup>. Em uma forma de realização mais específica, as ditas células CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> isoladas também são CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup> e CD105<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização, a dita população de célula produz um ou mais corpos como embrióide quando cultivadas sob condições que permitem a formação de corpos como embrióide. Em uma outra forma de realização, as células CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> produzem um ou mais corpos como embrióide quando cultivadas sob condições que permitem a formação de corpos como embrióide. Em uma outra forma de realização específica, a dita população de célula é isolada das células que não são células tronco. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> isoladas são isoladas das células placentárias ou células do cordão umbilical que não demonstram estes marcadores.

Em uma outra forma de realização, células tronco placentárias úteis nos métodos de tratamento aqui descritos são células CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, e CD200<sup>+</sup> isoladas. Em uma outra forma de realização específica, as células são HLA-G<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células isoladas são CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> ou CD45<sup>-</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células são CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> e CD45<sup>-</sup>. Em uma forma de realização mais específica, as células são CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, e HLA-G<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, e CD200<sup>+</sup> isoladas facilitam a formação de um ou mais corpos como embrióide em uma população de células placentárias ou células do cordão umbilical que compreendem as células tronco placentárias, quando a população é cultivada sob condições que permitem a formação de corpos como embrióide. Em uma outra forma de realização específica, as células placentárias isoladas são isoladas das células placentárias ou células do cordão umbilical que não demonstram estes marcadores.

Em uma outra forma de realização, uma população de célula útil nos métodos de tratamento aqui descritos é uma população isolada de células que compreende, por exemplo, isto é enriquecidas para, células tronco placentárias CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> isoladas. Em uma forma de realização específica, a dita população é uma população de células placentárias. Em uma outra forma de realização específica, a dita população é uma população de células do cordão umbilical. Em várias formas de realização, pelo menos cerca de 10 %, pelo menos cerca de 20 %, pelo menos cerca de 30 %, pelo menos cerca de 40 %, pelo menos cerca de 50 % ou pelo menos cerca de 60 % das células na dita população de célula são ditas células CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização, pelo menos cerca de 70 % das ditas células na dita população de célula são células CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> isoladas. Em uma outra forma de realização, pelo menos cerca de 80 %, 90 %, 95 % ou 99 % das células na dita população de célula são células CD73<sup>+</sup>,

CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> isoladas. Em uma forma de realização específica da dita população de célula, as células isoladas são HLA-G<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células isoladas são adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> ou CD45<sup>-</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células isoladas são adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> e CD45<sup>-</sup>. Em uma forma de realização mais específica, as células isoladas são adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, e HLA-G<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, a dita população de célula produz um ou mais corpos como embrióide quando cultivada sob condições que permitem a formação de corpos como embrióide. Em uma outra forma de realização específica, a dita população de célula é isolada das células que não são células tronco. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> isoladas são isoladas das células placentárias ou células do cordão umbilical que não demonstram estes marcadores.

Em certas outras formas de realização, as células tronco placentárias são células placentárias ou do cordão umbilical isoladas que são um ou mais de CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup>, ou ABC-p<sup>+</sup>. Em uma forma de realização específica, as células são CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, e OCT-4<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células são CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, e SH4<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células são CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, e OCT-4<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células são CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células são OCT-4<sup>+</sup> e ABC-p<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células são SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, e OCT-4<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização, as células são OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, e SSEA4<sup>-</sup>.

Em uma forma de realização específica, as células OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, e SSEA4<sup>-</sup> são adicionalmente CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, e SH4<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização, as células são OCT-4<sup>+</sup>, e CD34<sup>-</sup>, e SH3<sup>+</sup>, ou SH4<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização, as células são CD34<sup>-</sup> e CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, ou OCT-4<sup>+</sup>.

Em uma outra forma de realização, as células tronco placentárias úteis nos métodos de tratamento aqui descritos são células CD200<sup>+</sup> e OCT-4<sup>+</sup> células. Em uma forma de realização específica, as células são CD73<sup>+</sup> e CD105<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células são HLA-G<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> isoladas são CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> ou CD45<sup>-</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> isoladas são CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> e CD45<sup>-</sup>. Em uma forma de realização mais específica, as ditas células CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> isoladas são CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> e HLA-G<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> isoladas facilitam a produção de um ou mais corpos como embrióide por uma população de células placentárias ou células do cordão umbilical que compreendem as células tronco placentárias, quando a população é cultivada sob condições que permitem a formação de corpos como embrióide. Em uma outra forma de realização específica, as células CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> isoladas são isoladas das células placentárias que não são células tronco ou células multipotentes. Em uma outra forma de realização específica, as células CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> isoladas são isoladas das células placentárias que não demonstram estes marcadores.

Em uma outra forma de realização, uma população de célula útil nos métodos de tratamento aqui descrita é uma população isolada de células que compreende, por exemplo, isto é enriquecidas para, células tronco placentárias CD200<sup>+</sup>, OCT4. Em várias formas de realização, pelo menos cerca de 10 %, pelo menos cerca de 20 %, pelo menos cerca de 30 %, pelo

menos cerca de 40 %, pelo menos cerca de 50 % ou pelo menos cerca de 60 % das células na dita população de célula são as células CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> isoladas. Em uma outra forma de realização, pelo menos cerca de 70 % das ditas células são as células CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> isoladas. Em uma outra forma de

5 realização, pelo menos cerca de 80 %, 90 %, 95 % ou 99 % das células na dita população de célula são as ditas células CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> isoladas. Em uma forma de realização específica das populações isoladas, as ditas células CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> isoladas são adicionalmente CD73<sup>+</sup> e CD105<sup>+</sup>. Em uma

10 outra forma de realização específica, as ditas células CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> isoladas são adicionalmente HLA-G<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> isoladas são adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> e CD45<sup>-</sup>. Em uma forma de realização mais específica, as ditas células CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup> isoladas são adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> e HLA-G<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, a

15 população de célula produz um ou mais corpos como embrióide quando cultivadas sob condições que permitem a formação de corpos como embrióide.

Em uma outra forma de realização, células tronco placentárias úteis nos métodos de tratamento aqui descritos são células CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> e

20 HLA-G<sup>+</sup> isoladas. Em uma outra forma de realização específica, as células placentárias CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> e HLA-G<sup>+</sup> isoladas são adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> ou CD45<sup>-</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células placentárias CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> isoladas são adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> e CD45<sup>-</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células

25 placentárias CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> isoladas são adicionalmente OCT-4<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células placentárias CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> isoladas são adicionalmente CD200<sup>+</sup>. Em uma forma de realização mais específica, as células placentárias CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> isoladas são adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup> e CD200<sup>+</sup>. Em

uma outra forma de realização específica, as células placentárias CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> isoladas facilitam a formação de corpos como embrióide em uma população de células placentárias que compreende as dita células, quando a população é cultivada sob condições que permitem a formação de

5 corpos como embrióide. Em uma outra forma de realização específica, as ditas as células placentárias CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> isoladas são isoladas das células placentárias que não são as células placentárias CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> isoladas. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células placentárias CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> isoladas são isoladas das

10 células placentárias que não demonstram estes marcadores.

Em uma outra forma de realização, uma população de célula útil nos métodos de tratamento aqui descritos é uma população isolada de células que compreende, por exemplo, isto é enriquecidas para, células tronco placentárias CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> e HLA-G<sup>+</sup> isoladas. Em várias formas de

15 realização, pelo menos cerca de 10 %, pelo menos cerca de 20 %, pelo menos cerca de 30 %, pelo menos cerca de 40 %, pelo menos cerca de 50 % ou pelo menos cerca de 60 % das células na dita população de células são células CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização, pelo menos cerca de 70 % das células na dita população de células são células CD73<sup>+</sup>,

20 CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> isoladas. Em uma outra forma de realização, pelo menos cerca de 80 %, 90 %, 95 % ou 99 % das células na dita população de células são células CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> isoladas. Em uma forma de realização específica das populações acima, as ditas células CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> isoladas são adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> ou CD45<sup>-</sup>. Em uma outra forma de

25 realização específica, as ditas células CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> isoladas são adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> e CD45<sup>-</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> isoladas são adicionalmente OCT-4<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> isoladas são adicionalmente CD200<sup>+</sup>.

Em uma forma de realização mais específica, as ditas células  $CD73^+$ ,  $CD105^+$ ,  $HLA-G^+$  isoladas são adicionalmente  $CD34^-$ ,  $CD38^-$ ,  $CD45^-$ ,  $OCT-4^+$  e  $CD200^+$ .

Em uma outra forma de realização, as células tronco placentárias úteis nos métodos de tratamento aqui descritos são células isoladas que são  $CD73^+$  e  $CD105^+$  e facilitam a formação de um ou mais corpos como embrióide em uma população de células isoladas que compreendem as ditas células  $CD73^+$ ,  $CD105^+$  isoladas quando a dita população é cultivada sob condições que permitem a formação de corpos como embrióide. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células  $CD73^+$ ,  $CD105^+$  isoladas são adicionalmente  $CD34^-$ ,  $CD38^-$  ou  $CD45^-$ . Em uma outra forma de realização específica, as ditas células  $CD73^+$ ,  $CD105^+$  isoladas são adicionalmente  $CD34^-$ ,  $CD38^-$  e  $CD45^-$ . Em uma outra forma de realização específica, as ditas células  $CD73^+$ ,  $CD105^+$  isoladas são adicionalmente  $OCT-4^+$ . Em uma forma de realização mais específica, as ditas células  $CD73^+$ ,  $CD105^+$  isoladas são adicionalmente  $OCT-4^+$ ,  $CD34^-$ ,  $CD38^-$  e  $CD45^-$ . Em uma outra forma de realização específica, as ditas células  $CD73^+$ ,  $CD105^+$  isoladas são isoladas das células placentárias ou células do cordão umbilical que não demonstram estas características.

Em uma outra forma de realização, uma população de célula útil nos métodos de tratamento aqui descritos é uma população de células que compreende, por exemplo, isto é enriquecidas para, células tronco placentárias isoladas que são  $CD73^+$ ,  $CD105^+$  e facilitam a formação de um ou mais corpos como embrióide em uma população de células placentárias ou células do cordão umbilical isoladas que compreendem as ditas células quando a dita população é cultivada sob condições que permitem a formação de corpos como embrióide. Em várias formas de realização, pelo menos cerca de 10 %, pelo menos cerca de 20 %, pelo menos cerca de 30 %, pelo menos cerca de 40 %, pelo menos cerca de 50 % ou pelo menos cerca de 60 % das

células na dita população de células são as ditas células  $CD73^+$ ,  $CD105^+$  isoladas. Em uma outra forma de realização, pelo menos cerca de 70 % das células na dita população de células são as ditas células  $CD73^+$ ,  $CD105^+$  isoladas. Em uma outra forma de realização, pelo menos cerca de 80 %, 90 %, 95 % ou 99 % das células na dita população de células são as ditas células placentárias  $CD73^+$ ,  $CD105^+$  isoladas. Em uma forma de realização específica das populações acima, as ditas células  $CD73^+$ ,  $CD105^+$  isoladas são adicionalmente  $CD34^-$ ,  $CD38^-$  ou  $CD45^-$ . Em uma outra forma de realização específica, as ditas células  $CD73^+$ ,  $CD105^+$  isoladas são adicionalmente  $CD34^-$ ,  $CD38^-$  e  $CD45^-$ . Em uma outra forma de realização específica, as ditas células  $CD73^+$ ,  $CD105^+$  isoladas são adicionalmente  $OCT-4^+$ . Em uma outra forma de realização específica, as ditas células  $CD73^+$ ,  $CD105^+$  isoladas são adicionalmente  $CD200^+$ . Em uma forma de realização mais específica, as ditas células  $CD73^+$ ,  $CD105^+$  isoladas são adicionalmente  $CD34^-$ ,  $CD38^-$ ,  $CD45^-$ ,  $OCT-4^+$  e  $CD200^+$ . Em uma outra forma de realização específica, a dita população de célula é isolada das células placentárias que não demonstram estes marcadores.

Em uma outra forma de realização, as células tronco placentárias úteis nos métodos de tratamento aqui descritos são células  $OCT-4^+$  isoladas que facilitam formação de um ou mais corpos como embrióides em uma população de células placentárias isoladas que compreende as ditas células quando cultivadas sob condições que permitem a formação de corpos como embrióide. Em uma forma de realização específica, as ditas células placentárias  $OCT-4^+$  isoladas é adicionalmente  $CD73^+$  e  $CD105^+$ . Em uma outra forma de realização específica, as ditas células placentárias  $OCT-4^+$  isoladas é adicionalmente  $CD34^-$ ,  $CD38^-$  ou  $CD45^-$ . Em uma outra forma de realização específica, as ditas células placentárias  $OCT-4^+$  isoladas é adicionalmente  $CD200^+$ . Em uma forma de realização mais específica, as ditas células placentárias  $OCT-4^+$  isoladas é adicionalmente  $CD73^+$ ,  $CD105^+$ ,

CD200<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, e CD45<sup>-</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células placentárias OCT-4<sup>+</sup> isoladas, por exemplo, células tronco placentárias, são isoladas das células placentárias que não são células placentárias OCT-4<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células placentárias OCT-4<sup>+</sup> isoladas é isolada das células placentárias que não demonstram estas características.

Em uma outra forma de realização, uma população de célula útil nos métodos de tratamento aqui descritos é uma população de células que compreende, por exemplo, isto é enriquecidas para, células tronco placentárias que são OCT-4<sup>+</sup> e facilitam a formação de um ou mais corpos como embrióide em uma população de célula placentárias ou células do cordão umbilical isoladas que compreendem as ditas células quando a dita população é cultivada sob condições que permitem a formação de corpos como embrióide. Em várias formas de realização, pelo menos cerca de 10 %, pelo menos cerca de 20 %, pelo menos cerca de 30 %, pelo menos cerca de 40 %, pelo menos cerca de 50 % ou pelo menos cerca de 60 % das células na dita população de células são as ditas células OCT-4<sup>+</sup> isoladas. Em uma outra forma de realização, pelo menos cerca de 70 % das células na dita população de células são as ditas células OCT-4<sup>+</sup> isoladas. Em uma outra forma de realização, pelo menos cerca de 80 %, 90 %, 95 % ou 99 % das células na dita população de células são as ditas células OCT-4<sup>+</sup> isoladas. Em uma forma de realização específica das populações acima, as ditas células OCT-4<sup>+</sup> isoladas são adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> ou CD45<sup>-</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células OCT-4<sup>+</sup> isoladas são adicionalmente CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> e CD45<sup>-</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células OCT-4<sup>+</sup> isoladas são adicionalmente CD73<sup>+</sup> e CD105<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células OCT-4<sup>+</sup> isoladas são adicionalmente CD200<sup>+</sup>. Em uma forma de realização mais específica, as ditas células OCT-4<sup>+</sup> isoladas são adicionalmente CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>,

CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, e CD45<sup>-</sup>. Em uma outra forma de realização específica, a dita população de célula é isolada das células placentárias ou células do cordão umbilical que não demonstram estes marcadores.

Em uma outra forma de realização, as células tronco placentárias úteis nos métodos de tratamento aqui descritos são células placentárias HLA-A,B,C<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup> e CD34<sup>-</sup> isoladas. Em uma outra forma de realização, uma população de célula útil para os métodos de tratamento de aqui descritos é uma população isolada de células que compreende células tronco placentárias, em que pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 % ou pelo menos cerca de 99 % das células na dita população isolada de células são células tronco placentárias HLA-A,B,C<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup> e CD34<sup>-</sup> isoladas. Em uma forma de realização específica, a dita célula isolada ou população de célula isolada são isoladas das células que não são células HLA-A,B,C<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup> e CD34<sup>-</sup>. Em uma outra forma de realização específica, a ditas células placentárias isoladas não são maternas na origem. Em uma outra forma de realização específica, a dita população isolada de células são substancialmente isentas de componentes maternos; por exemplo, pelo menos cerca de 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 90 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % ou 99 % das ditas células na dita população isolada de células não são maternas na origem.

Em uma outra forma de realização, as células tronco placentárias úteis nos métodos de tratamento aqui descritos são células CD10<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD117<sup>-</sup> e CD133<sup>-</sup> isoladas. Em uma outra forma de realização, uma população de célula útil para os métodos de tratamento aqui descritos é uma população de células que compreende células tronco placentárias, em que pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 % ou pelo menos cerca de 99 % das células na dita população de células são células tronco

placentárias CD10<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD117<sup>-</sup> e CD133<sup>-</sup> isoladas. Em uma forma de realização específica, as ditas células isoladas ou população isolada de células são isoladas das células que não são as ditas células. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células CD10<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD117<sup>-</sup> e CD133<sup>-</sup> isoladas não são maternas na origem, isto é, têm o genótipo fetal. Em uma outra forma de realização específica, pelo menos cerca de 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 90 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % ou 99 % das ditas células na dita população isolada de células não são maternas na origem. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células isoladas ou população isolada de células placentárias são isoladas das células que não demonstram estas características.

Em uma outra forma de realização, as células tronco placentárias úteis nos métodos de tratamento aqui descritos são células CD10<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, e CD117<sup>-</sup> isoladas. Em uma outra forma de realização, uma população de célula útil para os métodos de tratamento aqui divulgados é uma população de células que compreende, por exemplo, enriquecidas para, célula placentárias isoladas, em que pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 % ou pelo menos cerca de 99 % das células na dita população de células são células tronco placentárias CD 10<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, e CD117<sup>-</sup> isoladas. Em uma forma de realização específica, a dita célula isolada ou população isolada de células é isolada das células que não são as ditas células. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células isoladas não são maternas na origem. Em uma outra forma de realização específica, pelo menos cerca de 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 90 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % ou 99 % das ditas células na dita população de célula não são maternas na origem. Em uma outra forma de realização específica, a dita célula isolada ou população isolada de células placentárias são isoladas das células que não demonstram estes marcadores.

Em uma outra forma de realização, as células tronco placentárias úteis nos métodos de tratamento aqui descritos são células CD10<sup>-</sup>, CD13<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, e CD117<sup>-</sup> isoladas. Em uma outra forma de realização, uma população de célula útil para os métodos de tratamento aqui divulgados é uma população isolada de células que compreendem, por exemplo, enriquecidas para, células tronco placentárias CD10<sup>-</sup>, CD13<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, e CD117<sup>-</sup> isoladas, em que pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 % ou pelo menos cerca de 99 % das células na dita população são as ditas células CD10<sup>-</sup>, CD13<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, e CD117<sup>-</sup>. Em uma forma de realização específica, as ditas células isoladas ou população isolada de células são isoladas das células que não são as ditas células. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células isoladas não são maternas na origem. Em uma outra forma de realização específica, pelo menos cerca de 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 90 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % ou 99 % das ditas células na dita população de célula não são maternas na origem. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células isoladas ou população isolada de células são isoladas das células que não demonstram estas características.

Em uma outra forma de realização, as células tronco placentárias úteis nos métodos de tratamento aqui descritos são células HLA-A,B,C<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, e CD133<sup>-</sup> que são adicionalmente CD10<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> e/ou HLA-G<sup>+</sup>, e/ou negativas quanto a CD117. Em uma outra forma de realização, uma população de célula útil para os métodos de tratamento aqui divulgados é uma população isolada de células que compreende, por exemplo, enriquecidas para, células tronco placentárias isoladas, em que pelo menos cerca de 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % ou cerca de 99 % das células na dita população são células tronco placentárias que são HLA-A,B,C<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, e que são

adicionalmente positivas quanto a CD10, CD13, CD38, CD44, CD90, CD105, CD200 e/ou HLAG, e/ou negativas quanto a CD117. Em uma forma de realização específica, as ditas células isoladas ou população isolada de células são isoladas das células que não são as ditas células. Em uma outra  
 5 forma de realização específica, as ditas células placentárias isoladas não são maternas na origem. Em uma outra forma de realização específica, pelo menos cerca de 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 90 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % ou 99 % das ditas células na dita população de célula não são maternas na origem. Em uma outra forma de realização específica, as  
 10 ditas células isoladas ou população isolada de células são isoladas das células placentárias que não demonstram estes marcadores.

Em uma outra forma de realização, as células tronco placentárias úteis nos métodos de tratamento aqui descritos são células isoladas que são CD200<sup>+</sup> e CD10<sup>+</sup>, como determinado pela ligação de  
 15 anticorpo, e CD117<sup>-</sup>, como determinado tanto pela ligação de anticorpo quanto pela RT-PCR. Em uma outra forma de realização, as células tronco placentárias úteis nos métodos de tratamento aqui divulgados são células isoladas, por exemplo, células tronco ou células multipotentes, que são CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup>, HLA classe I<sup>+</sup> e  $\beta$ -2-  
 20 microglobulina<sup>+</sup>.

Em uma outra forma de realização, as células tronco placentárias úteis nos métodos de tratamento aqui descritos são células placentárias ou células do cordão umbilical isoladas, por exemplo, células tronco placentárias, células multipotentes placentárias, células tronco do  
 25 cordão umbilical ou células multipotentes do cordão umbilical, que são um ou mais de CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54/ICAM<sup>+</sup>, CD62E<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CD62P<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD103<sup>-</sup>, CD104<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD144/VE-caderina<sup>baixo</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>, 132-microglobulina<sup>baixo</sup>, MHC-I<sup>baixo</sup>, MHC-II<sup>-</sup>, HLA-G<sup>baixo</sup>, e/ou PDL1<sup>baixo</sup>. Em uma forma de realização

específica, as células isoladas são pelo menos CD29<sup>+</sup> e CD54<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células isoladas são pelo menos CD44<sup>+</sup> e CD106<sup>+</sup>. Em uma outra forma de realização específica, as células isoladas são pelo menos CD29<sup>+</sup>.

5                   Em uma outra forma de realização, uma população de célula útil nos métodos de tratamento aqui descritos compreende células tronco placentárias isoladas, e pelo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % ou 99 % das células na dita população de célula são células isoladas tronco placentárias que são um ou mais de CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>,  
10   CD54/ICAM<sup>+</sup>, CD62-E<sup>-</sup>, CD62-L<sup>-</sup>, CD62-P<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD103<sup>-</sup>, CD104<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD144/VE-caderina<sup>baixo</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>,  $\beta$ 2-microglobulin<sup>baixo</sup>, HLA-I<sup>baixo</sup>, HLA-II<sup>-</sup>, HLA-G<sup>baixo</sup>, e/ou PDL1<sup>baixo</sup>. Em uma forma de realização mais específica, pelo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % ou 99 % das células tronco placentárias na dita população de  
15   célula são CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54/ICAM<sup>+</sup>, CD62-E<sup>-</sup>, CD62-L<sup>-</sup>, CD62-P<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD103<sup>-</sup>, CD104<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD106/VCAM<sup>+</sup>, CD144/VE-caderina<sup>baixo</sup>, CD184/CXCR4<sup>-</sup>,  $\beta$ 2-microglobulin<sup>baixo</sup>, MHC-I<sup>baixo</sup>, MHC-II<sup>-</sup>, HLA-G<sup>baixo</sup> e PDL1<sup>baixo</sup>.

20                   Em uma outra forma de realização, as células tronco placentárias úteis nos métodos de tratamento aqui descritos são células placentárias ou células do cordão umbilical isoladas (por exemplo, células tronco ou células multipotentes) que são um ou mais ou todas, de CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, SH2<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup>, SH4<sup>+</sup>, SSEA3<sup>-</sup>, SSEA4<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup>, e ABC-p<sup>+</sup>, onde ABC-p é uma proteína  
25   transportadora ABC específica da placenta (também conhecida como proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP) e como proteína de resistência à mitoxantrona (MXR)), em que as ditas células tronco placentárias são obtidas pela perfusão de uma placenta de mamífero, por exemplo, de ser humano, que foi drenada de sangue do cordão e perfundida a remover o sangue residual.

Em uma outra forma de realização, as células tronco placentárias úteis nos métodos de tratamento aqui descritos são células placentárias ou células do cordão umbilical isoladas em que a expressão de pelo menos um marcador celular nas ditas células é pelo menos duas vezes  
5 mais alta do que para uma célula tronco mesenquimatosa (por exemplo, uma célula tronco mesenquimatosa derivada da medula óssea) ou fibroblasto dérmico. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células isoladas não são maternas na origem (isto é, têm o genótipo fetal). Em uma outra forma de realização específica, a dita parte contida dentro de uma  
10 população de célula, em que pelo menos cerca de 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % ou 99 % das células na dita população de célula são células tronco placentárias que não são maternas na origem.

A definição do perfil de gene confirma que as células tronco placentárias isoladas, e populações de células tronco placentárias isoladas, são  
15 distinguíveis de outras células, por exemplo, fibroblastos dérmicos ou células tronco mesenquimatosas, por exemplo, células tronco mesenquimatosas derivadas da medula óssea, com base na expressão de certos genes. As células tronco placentárias isoladas aqui descritas podem ser distinguidas, por  
20 exemplo, dos fibroblastos dérmicos ou células tronco mesenquimatosas derivadas da medula óssea com base na expressão de um ou mais genes, a expressão destes é significativamente mais alta (por exemplo, de modo estatístico significativamente mais alta ou duas vezes mais alta) nas células tronco placentárias em comparação com os fibroblastos dérmicos ou células  
25 tronco mesenquimatosas derivadas da medula óssea. Em particular, as células tronco placentárias podem ser distinguidas das células tronco mesenquimatosas com base na expressão de um ou mais genes, a expressão destes é significativamente mais alta (isto é, pelo menos duas vezes mais alta) nas células tronco placentárias do que em um número equivalente de

fibroblastos dérmicos ou células tronco mesenquimatosas derivadas da medula óssea, em que o um ou mais genes são ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, ILIA, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, ZC3H12A ou uma combinação de qualquer um dos precedentes, quando as células são cultivadas sob condições equivalentes. Ver, por exemplo, Publicação do Pedido de Patente U.S. Nº 2007/0275362, a divulgação do mesmo é aqui incorporada por referência em sua totalidade. Em uma forma de realização mais específica, as ditas células tronco placentárias expressam o dito um ou mais genes (diferencialmente comparados aos fibroblastos dérmicos ou células tronco mesenquimatosas derivadas da medula óssea) quando cultivadas para cerca de 3 a cerca de 35 duplicatas de população em um meio que compreende DMEM-LG (por exemplo, da Gibco); 2 % de soro de bezerro fetal (por exemplo, da Hyclone Labs.); 1x insulina-transferrina-selênio (ITS); 1x ácido linoléico-albumina sérica bovina (LA-BSA);  $10^{-9}$  M de dexametasona (por exemplo, da Sigma);  $10^{-4}$  M de ácido ascórbico 2-fosfato (por exemplo, da Sigma); fator de crescimento epidérmico 10 ng/ml (por exemplo, da R&D Systems); e fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF-BB) 10 ng/ml (por exemplo, da R&D Systems). Em uma forma de realização específica, o gene específico da célula tronco placentária é CD200.

Sequências específicas para estes genes podem ser encontradas no GenBank nos acessos nºs NM\_001615 (ACTG2), BC065545 (ADARB1), (NM\_181847 (AMIGO2), AY358590 (ARTS-1), BC074884 (B4GALT6), BC008396 (BCHE), BC020196 (C11orf9), BC031103 (CD200), NM\_001845 (COL4A1), NM\_001846 (COL4A2), BC052289 (CPA4), BC094758

(DMD), AF293359 (DSC3), NM\_001943 (DSG2), AF338241 (ELOVL2), AY336105 (F2RL1), NM\_018215 (FLJ10781), AY416799 (GATA6), BC075798 (GPR126), NM\_016235 (GPRC5B), AF340038 (ICAM1), BC000844 (IER3), BC066339 (IGFBP7), BC013142 (IL1A), BT019749  
 5 (IL6), BC007461 (IL18), (BC072017) KRT18, BC075839 (KRT8), BC060825 (LIPG), BC065240 (LRAP), BC010444 (MATN2), BC011908 (MEST), BC068455 (NFE2L3), NM\_014840 (NUAK1), AB006755 (PCDH7), NM\_014476 (PDLIM3), BC126199 (PKP-2), BC090862 (RTN1), BC002538 (SERPINB9), BCO23312 (ST3GAL6), BC001201  
 10 (ST6GALNAC5), BC126160 ou BC065328 (SLC12A8), BC025697 (TCF21), BC096235 (TGFB2), BC005046 (VTN), e BC005001 (ZC3H12A) como de março de 2008.

Em uma forma de realização mais específica, as ditas células tronco placentárias expressam cada uma de ACTG2, ADARB1, AMIGO2,  
 15 ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUAK1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2,  
 20 VTN, e ZC3H12A em um nível detectável mais alto do que um número equivalente de células tronco mesenquimatosas derivadas da medula óssea, quando as células são cultivadas sob condições equivalentes.

Expressão dos genes aludidos acima pode ser avaliada pelas técnicas padrão. Por exemplo, sondas com base na sequência do(s) gene(s)  
 25 podem ser individualmente selecionadas e construídas pelas técnicas convencionais. A expressão dos genes pode ser avaliada, por exemplo, em um microarranjo que compreende sondas para um ou mais dos genes, por exemplo, um arranjo GENECHIP® Human Genome U133A 2.0 da Affymetrix ou um GENECHIP® Human Genome U133 Plus 2.0 da

Affymetrix (Santa Clara, Califórnia). A expressão destes genes pode ser avaliada mesmo se a sequência para um número de acesso no GenBank particular é corrigida porque as sondas específicas para a sequência corrigida podem ser facilmente geradas usando técnicas padrão bem conhecidas.

5 O nível de expressão destes genes pode ser usado para confirmar a identidade de uma população de células tronco placentárias isoladas, para identificar uma população isolada de células como a que compreende pelo menos uma pluralidade de células tronco placentárias ou semelhantes. Populações de células isoladas que compreendem células tronco  
10 placentárias, a identidade destas é confirmada, podem ser clonais, por exemplo, populações de células tronco placentárias isoladas expandidas de uma única célula tronco placentária isolada ou uma população de células tronco misturada que compreende células tronco placentárias, por exemplo, uma população de células que compreende células tronco placentárias que são  
15 expandidas de células tronco placentárias isoladas múltiplas ou uma população de células que compreende células tronco placentárias isoladas, como aqui descritas, e pelo menos um outro tipo de célula.

O nível de expressão destes genes pode ser usado para selecionar populações de células placentárias isoladas. Por exemplo, uma  
20 população de células, por exemplo, células clonalmente expandidas, pode ser selecionada se a expressão de um ou mais dos genes listados acima for significativamente mais alta em uma amostra da população de células do que em uma população equivalente de células tronco mesenquimatosas. Tal seleção pode ser de uma população de uma pluralidade de populações de  
25 célula placentária isoladas, de uma pluralidade de populações de célula, a identidade das quais não é conhecida, etc.

As células placentárias isoladas, por exemplo, células tronco placentárias podem ser selecionadas com base no nível de expressão de um ou mais de tais genes quando comparados ao nível de expressão do dito um ou

mais genes, por exemplo, em uma célula tronco mesenquimatosa de controle, por exemplo, o nível de expressão dos ditos um ou mais genes em um número equivalente de células tronco mesenquimatosas derivadas da medula óssea. Em uma forma de realização, o nível de expressão do dito um ou mais genes em uma amostra que compreende um número equivalente de células tronco mesenquimatosas é usado como um controle. Em uma outra forma de realização, o controle, para as células placentárias isoladas testadas sob certas condições, é um valor numérico que representa o nível de expressão do dito um ou mais genes nas células tronco mesenquimatosas sob as ditas condições.

As células tronco placentárias isoladas aqui descritas demonstram as características acima (por exemplo, combinações de marcadores da superfície de célula e/ou perfil de expressão de genes) em cultura primária ou durante a proliferação em meio que compreende, por exemplo, DMEM-LG (Gibco), 2 % de soro de bezerro fetal (FCS) (Hyclone Laboratories), 1x insulina-transferrina-selênio (ITS), 1x lenolenicacid-albumina sérica bovina (LA-BSA),  $10^{-9}$  M de dexametasona (Sigma),  $10^{-4}$  M de ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma), fator de crescimento epidérmico (EGF) 10 ng/ml (R&D Systems), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF-BB) 10 ng/ml (R&D Systems), e 100 U de penicilina/1000 U de estreptomicina.

Em uma outra forma de realização específica das ditas células placentárias isoladas, por exemplo, células tronco placentárias ou populações de células que compreendem as células placentárias isoladas, as ditas células ou população tendo sido expandidas, por exemplo, passadas pelo menos, cerca de ou não mais do que, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 vezes ou proliferadas por pelo menos, cerca de ou não mais do que, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 ou 40 duplicatas da população. Em uma outra forma de realização específica das células placentárias isoladas, por exemplo, células tronco

placentárias ou populações de células que compreendem as células placentárias isoladas, que são aqui divulgadas, as ditas células placentárias isoladas são fetais na origem (isto é, têm o genótipo fetal).

5 Em certas formas de realização de células placentárias isoladas, por exemplo, células tronco placentárias, as ditas células placentárias isoladas não se diferenciam durante a cultura em meio de crescimento, isto é, meio formulado para promover a proliferação, por exemplo, durante a proliferação em meio de crescimento. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células placentárias isoladas, por exemplo, células tronco  
10 placentárias, não requerem uma camada alimentadora de modo a proliferar. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células placentárias isoladas não se diferenciam em cultura na ausência de uma camada alimentadora, unicamente por causa da falta de uma camada de célula alimentadora.

15 Em uma outra forma de realização, as células tronco placentárias úteis nos métodos de tratamento aqui divulgados são células placentárias ou células do cordão umbilical isoladas, em que uma pluralidade das células são positivas quanto à aldeído desidrogenase (ALDH), como avaliadas por um ensaio de atividade da aldeído desidrogenase. Tais ensaios  
20 são conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Bostian e Betts, Biochem. J., 173, 787, (1978)). Em uma forma de realização específica, o dito ensaio de ALDH usa ALDEFLUOR® (Aldagen, Inc., Ashland, Oregon) como um marcador da atividade de aldeído desidrogenase. Em uma forma de realização específica, a dita pluralidade está entre cerca de 3 % e cerca de 25 % das  
25 células na dita população de células. Em uma outra forma de realização, as ditas células tronco placentárias apresentam atividade de ALDH pelo menos três vezes ou pelo menos cinco vezes, mais alta do que uma população de células tronco mesenquimatosas derivadas da medula óssea tendo cerca do mesmo número de células e cultivadas sob as mesmas condições.

Em certas formas de realização de qualquer uma das populações de células que compreendem células tronco placentárias, como aqui descritas, as células tronco placentárias nas ditas populações de células são substancialmente isentas de células tendo um genótipo materno; por exemplo, pelo menos 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % ou 99 % das, por exemplo, células tronco placentárias nas ditas populações têm um genótipo fetal. Em certas outras formas de realização de qualquer uma das populações de células que compreendem as células tronco placentárias aqui descritas, as populações de células que compreendem as ditas células tronco placentárias são substancialmente isentas de células tendo um genótipo materno; por exemplo, pelo menos 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % ou 99 % das células (por exemplo, células tronco placentárias) na dita população têm um genótipo fetal.

Em uma forma de realização específica de qualquer uma das acima isoladas, por exemplo, células tronco placentárias ou populações de célula isoladas que compreendem, por exemplo, as células tronco placentárias, o cariótipo, por exemplo, das células tronco placentárias ou pelo menos cerca de 95 % ou cerca de 99 % das células na dita população, é normal. Em uma outra forma de realização específica de qualquer uma das células tronco placentárias ou populações de célula acima, as células tronco placentárias ou, por exemplo, células tronco placentárias na população de células, não são maternas na origem.

As células tronco placentárias isoladas ou populações de células isoladas que compreendem células tronco placentárias, por exemplo, que consistem essencialmente de células tronco placentárias, que carregam qualquer uma das combinações acima de marcadores, podem ser combinadas em qualquer razão. Qualquer duas ou mais das populações de célula isolada acima podem ser combinadas para formar uma população de célula isolada.

Por exemplo, uma população isolada de células pode compreender uma primeira população de células definidas por uma das combinações de marcador descritas acima, e uma segunda população de células definida por uma outra das combinações de marcador descritas acima, em que a dita primeira e segunda populações são combinadas em uma razão, por exemplo, de cerca de 1:99, 2:98, 3:97, 4:96, 5:95, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2 ou cerca de 99:1. Em maneira similar, qualquer três, quatro, cinco ou mais das células ou populações de célula isolada podem ser combinadas.

As células tronco placentárias isoladas úteis nos métodos de tratamento aqui divulgados podem ser obtidas, por exemplo, pelo rompimento de tecido placentário ou tecido do cordão umbilical, com ou sem digestão enzimática (ver a Seção 5.5.3) ou pela perfusão (ver a Seção 5.5.4). Por exemplo, as populações de células tronco placentárias isoladas podem ser produzidas de acordo com um método que compreende perfundir uma placenta de mamífero que foi drenada de sangue do cordão e perfundida para remover sangue residual; perfundindo a dita placenta com uma solução de perfusão; e coletar a dita solução de perfusão, em que a dita solução de perfusão depois da perfusão compreende uma população de células placentárias que compreende células placentárias isoladas; e isolando-se uma pluralidade das ditas células placentárias isoladas da dita população de células. Em uma forma de realização específica, a solução de perfusão é passada através tanto da veia umbilical quanto das artérias umbilicais e coletada depois que ela exuda da placenta. Em uma outra forma de realização específica, a solução de perfusão é passada através da veia umbilical e coletada das artérias umbilicais ou passadas através das artérias umbilicais e coletada da veia umbilical.

Em várias formas de realização, as células tronco placentárias isoladas, contidas dentro de uma população de células obtidas da perfusão de

uma placenta, são pelo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % ou pelo menos 99,5 % da dita população de células placentárias. Em uma outra forma de realização específica, as células tronco placentárias isoladas coletadas pela perfusão compreendem células fetais e maternas. Em uma  
5 outra forma de realização específica, as células placentárias isoladas coletadas pela perfusão são pelo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % ou pelo menos 99,5 % de células fetais.

Em uma outra forma de realização específica, é aqui fornecida uma composição que compreende uma população das células placentárias  
10 isoladas, por exemplo, células tronco placentárias, como aqui descritas, coletadas pela perfusão, em que a dita composição compreende pelo menos uma porção da solução de perfusão usada para coletar as células placentárias isoladas.

Em certas formas de realização, populações isoladas das  
15 células tronco placentárias aqui descritas podem ser produzidas pela digestão de tecido placentário ou tecido do cordão umbilical com uma enzima rompedora de tecido para se obter uma população de células que compreendem as células tronco placentárias, e isolando-se ou substancialmente isolando-se, uma pluralidade das células tronco placentárias  
20 do resto das ditas células placentárias ou do cordão umbilical. O todo ou qualquer parte da placenta ou cordão umbilical podem ser digeridos para se obter as células tronco placentárias aqui descritas. Em formas de realização específicas, por exemplo, o dito tecido pode ser uma placenta inteira, uma membrana amniótica, córion, uma combinação de âmnio e córion, cordão  
25 umbilical ou uma combinação de qualquer um dos precedentes. Em outra forma de realização específica, a enzima rompedora de tecido é tripisina, collagenase, dispase ou semelhantes. Em várias formas de realização, as células tronco placentárias isoladas, contidas dentro de uma população de células obtidas da digestão de uma placenta, são pelo menos 50 %, 60 %, 70

%, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % ou pelo menos 99,5 % da dita população de células placentárias.

As populações isoladas de células tronco placentárias ou populações isoladas de células que compreendem células tronco placentárias, descritas acima, podem compreender cerca de, pelo menos ou no mais do que,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$  ou mais das células placentárias isoladas. As populações de células placentárias isoladas úteis nos métodos de tratamento aqui descritos compreendem pelo menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % ou 99 % das células placentárias isoladas viáveis, como determinado, por exemplo, pela exclusão em azul de tripano.

#### 4.2.3 Crescimento em cultura

O crescimento das células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, aqui descritas, como para qualquer célula de mamífero, depende em parte do meio particular selecionado para o crescimento. Sob condições ideais, as células tronco placentárias tipicamente duplicam em número em 1 a 5 dias. Durante a cultura, as células tronco placentárias aqui fornecidas aderem a um substrato em cultura, por exemplo a superfície de um recipiente de cultura de tecido (por exemplo, placa plástica de cultura de tecido, plástica revestida com fibronectina, e outros) e formam uma monocamada.

As populações de células placentárias isoladas que compreendem as células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, quando cultivadas sob condições apropriadas, podem formar corpos como embrióide, isto é, grupos tri dimensionais de células cultivadas no topo da camada de células tronco placentárias aderentes. As células dentro dos corpos como embrióide expressam marcadores associados com muitas células tronco iniciais, por exemplo, OCT-4, Nanog, SSEA3 e SSEA4. As células dentro dos corpos como embrióide são tipicamente não aderentes ao

substrato de cultura, como o são as células tronco placentárias aqui descritas, mas permanecem ligadas às células aderentes durante a cultura. As células do corpo como embrióide são dependentes das células tronco placentárias quanto a viabilidade, visto que os corpos como embrióide não se formam na ausência das células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias. As células tronco placentárias aderentes facilitam assim o crescimento de um ou mais corpos como embrióide em uma população de células placentárias que compreendem as células tronco placentárias. Sem desejar estar ligado pela teoria, as células dos corpos como embrióide são consideradas crescer nas células tronco placentárias aderentes muito como as células tronco embrionárias crescem em uma camada de células alimentadoras. As células tronco mesenquimatosas, por exemplo, células tronco mesenquimatosas derivadas da medula óssea, não desenvolvem corpos como embrióide em cultura.

#### 4.3 MÉTODOS DE OBTER CÉLULAS TRONCO PLACENTÁRIAS 4.3.1 Composição de Coleta de Célula Tronco

As células tronco placentárias podem ser coletadas e isoladas de acordo com os métodos aqui fornecidos. No geral, as células tronco são obtidas de uma placenta ou cordão umbilical de mamífero usando uma solução fisiologicamente aceitável, por exemplo, uma composição de coleta de célula tronco. Uma composição de coleta de célula tronco é descrita em detalhes na Publicação do Pedido de Patente U.S. Nº 2007/0190042, a divulgação desta é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

A composição de coleta de célula tronco pode compreender qualquer solução fisiologicamente aceitável adequada para a coleta e/ou cultura de células tronco, por exemplo, uma solução salina (por exemplo, solução salina tamponada com fosfato, solução de Krebs, solução de Krebs modificada, solução de Eagle, 0,9 % de NaCl, etc.), um meio de cultura (por exemplo, DMEM, HDMEM, etc.), e outros.

A composição de coleta de célula tronco pode compreender um ou mais componentes que tendem a preservar as células tronco placentárias, isto é, impedir as células tronco placentárias de secar ou retardar a morte das células tronco placentárias, reduzir o número de células tronco placentárias em uma população de células que morrem ou semelhantes, a partir do momento da coleta até o momento de cultura. Tais componentes podem ser, por exemplo, um inibidor da apoptose (por exemplo, um inibidor da caspase ou inibidor de INK); um vasodilatador (por exemplo, sulfato de magnésio, um medicamento antihipertensivo, peptídeo natriurético atrial (ANP), adrenocorticotropina, hormônio que libera corticotropina, nitroprussida de sódio, hidralazina, trifosfato de adenosina, adenosina, indometacina ou sulfato de magnésio, um inibidor da fosfodiesterase, etc.); um inibidor da necrose (por exemplo, 2-(1H-indol-3-il)-3-pentilamino-maleimida, ditiocarbamato de pirrolidina ou clonazepam); um inibidor de TNF- $\alpha$ ; e/ou um perfluorocarbono que carrega oxigênio (por exemplo, brometo de perfluorooctila, brometo de perfluorodecila, etc.).

A composição de coleta de célula tronco pode compreender uma ou mais enzimas que degradam tecido, por exemplo, uma metaloprotease, uma serina protease, uma protease neutra, uma RNase ou uma DNase ou semelhante. Tais enzimas incluem, mas não são limitadas a, collagenases (por exemplo, collagenase I, II, III ou IV, uma collagenase de *Clostridium histolyticum*, etc.); dispase, termolisina, elastase, tripisina, LIBERASE<sup>®</sup>, hialuronidase, e outros.

A composição de coleta de célula tronco pode compreender uma quantidade bacteriocida ou bacteriostaticamente eficaz de um antibiótico. Em certas formas de realização não limitantes, o antibiótico é um macrolídeo (por exemplo, tobramicina), uma cefalosporina (por exemplo, cefalexina, cefradina, cefuroxima, cefprozil, cefaclor, cefixima ou cefadroxil), uma claritromicina, uma eritromicina, uma penicilina (por exemplo, penicilina V)

ou uma quinolona (por exemplo, ofloxacina, ciprofloxacina ou norfloxacina), uma tetraciclina, uma estreptomicina, etc. Em uma forma de realização particular, o antibiótico é ativo contra bactérias Gram(+) e/ou Gram(-), por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, e outros.

5                   A composição de coleta de célula tronco também pode compreender um ou mais dos seguintes compostos: adenosina (cerca de 1 mM a cerca de 50 mM); D-glicose (cerca de 20 mM a cerca de 100 mM); íons magnésio (cerca de 1 mM a cerca de 50 mM); uma macromolécula de peso molecular maior do que 20.000 daltons, em uma forma de realização, 10 presentes em uma quantidade suficiente para manter a integridade endotelial e viabilidade celular (por exemplo, um colóide sintético ou que ocorre naturalmente, um polissacarídeo tal como dextrano ou um polietileno glicol presentes em cerca de 25 g/l a cerca de 100 g/l ou cerca de 40 g/l a cerca de 60 g/l); um antioxidante (por exemplo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno 15 butilado, glutathione, vitamina C ou vitamina E presentes em cerca de 25 µM a cerca de 100 µM); um agente redutor (por exemplo, N-acetilcisteína presente em cerca de 0,1 mM a cerca de 5 mM); um agente que impede o cálcio de entrar dentro das células (por exemplo, verapamil presente em cerca de 2 µM a cerca de 25 µM); nitroglicerina (por exemplo, cerca de 0,05 g/L a cerca de 20 0,2 g/L); um anticoagulante, em uma forma de realização, presente em uma quantidade suficiente para ajudar a prevenir a coagulação do sangue residual (por exemplo, heparina ou hirudina presentes em uma concentração de cerca de 1000 unidades/l a cerca de 100.000 unidades/l); ou um composto contendo amilorida (por exemplo, amilorida, etil isopropil amilorida, hexametileno 25 amilorida, dimetil amilorida ou isobutil amilorida presentes em cerca de 1,0 µM a cerca de 5 µM).

#### 4.3.2 Coleta e Manuseio de Placenta e Cordão Umbilical

No geral, uma placenta humana, com cordão umbilical, é recuperada logo depois da sua expulsão depois do nascimento. Em uma forma

de realização preferida, a placenta é recuperada de uma paciente depois de informado consentimento e depois de uma história médica completa da paciente ser considerada e é associada com a placenta. Preferivelmente, a história médica continua depois da liberação. Uma tal história médica pode ser usada para coordenar o uso subsequente da placenta/cordão umbilical ou das células tronco colhidas destas. Por exemplo, as células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, podem ser usadas, considerando-se a história médica, para a medicina personalizada para o bebê associada com a placenta e cordão umbilical ou para os pais, irmãos e irmãs ou outros parentes do bebê.

Antes da recuperação das células tronco placentárias, o sangue do cordão umbilical e o sangue placentário são removidos. Em certas formas de realização, depois da liberação, o sangue do cordão e o sangue placentário são recuperados. A placenta pode ser individualizada a um processo de recuperação do sangue do cordão convencional. Tipicamente uma agulha ou cânula são usadas, com a ajuda da gravidade, para exsanguinar a placenta (ver, por exemplo, Anderson, Patente U.S. Nº 5.372.581; Hessel et al., Patente U.S. Nº 5.415.665). A agulha ou cânula são usualmente colocadas na veia umbilical e a placenta pode ser suavemente massageada para ajudar na drenagem do sangue do cordão da placenta. Tal recuperação do sangue do cordão pode ser realizada comercialmente, por exemplo, LifeBank Inc., Cedar Knolls, N.J., ViaCord, Cord Blood Registry and Cryocell. Em certas formas de realização, a placenta é drenada por gravidade sem outra manipulação de modo a minimizar o rompimento do tecido durante a recuperação do sangue do cordão.

Tipicamente, uma placenta é transportada da sala de parto ou nascimento para um outro local, por exemplo, um laboratório, para a recuperação de sangue do cordão e coleta de células tronco, por exemplo, pela perfusão ou dissociação do tecido. A placenta é preferivelmente transportada

em um dispositivo de transporte estéril, termicamente isolado (mantendo a temperatura da placenta entre 20 e 28° C), por exemplo, colocando-se a placenta, com o cordão umbilical proximal preso, em uma bolsa plástica fechado com fecho de correr estéril, isto é depois de colocada em um  
5 recipiente isolado. Em uma outra forma de realização, a placenta é transportada em um kit de coleta do sangue do cordão substancialmente como descrito no Pedido de Patente Pendente dos estados Unidos Nº 2006/0060494, depositado em 19 de setembro de 2005 ou na Patente U.S. Nº 7.147.626. Preferivelmente, a placenta é liberada para o laboratório de quatro a vinte e  
10 quatro horas a seguir do parto. Em certas formas de realização, o cordão umbilical proximal é preso, preferivelmente dentro de 4 a 5 cm (centímetros) da inserção no disco placentário antes da recuperação do sangue do cordão. Em certas outras formas de realização, o cordão umbilical é preso distalmente, por exemplo, no ou próximo do final do cordão umbilical longe  
15 da placenta. Em outras formas de realização, o cordão umbilical é preso depois da recuperação do sangue do cordão mas antes de processamento adicional da placenta.

A placenta e cordão umbilical, antes da coleta da célula tronco, podem ser armazenados sob condições estéreis e na temperatura ambiente ou  
20 em uma temperatura de 5 a 25° C (centígrados). A placenta e o cordão umbilical podem ser armazenados por um período mais longo do que quarenta e oito horas, e preferivelmente por um período de quatro a vinte e quatro horas antes de perfusar a placenta para remover qualquer sangue do cordão residual. A placenta e o cordão umbilical são preferivelmente armazenados  
25 em uma solução anticoagulante em uma temperatura de 5 a 25° C (centígrados). As soluções anticoagulantes adequadas são bem conhecidas na técnica. Por exemplo, uma solução de heparina ou varfarina sódica pode ser usada. Em uma forma de realização preferida, a solução anticoagulante compreende uma solução de heparina (por exemplo, 1 % p/p em solução

1:1000). A placenta e o cordão umbilical exsanguinados são preferivelmente armazenados por não mais do que 36 horas antes que as células, por exemplo, células tronco placentárias, sejam coletadas.

A placenta de mamífero ou uma parte desta ou o cordão umbilical, uma vez coletados e preparados no geral como acima, podem ser tratados em qualquer maneira conhecida na técnica, por exemplo, podem ser perfundidos ou rompidos, por exemplo, digeridos com uma ou mais enzimas rompedoras de tecido, para se obter células tronco.

#### 4.3.3 Rompimento Físico e Digestão Enzimática de Tecido

Em uma forma de realização, as células tronco são coletadas de uma placenta ou cordão umbilical de mamífero pelo rompimento físico, por exemplo, digestão enzimática, por exemplo, usando a composição de coleta de célula tronco descrita na Seção 4.3.1, acima. Por exemplo, a placenta ou uma porção desta ou cordão umbilical pode ser, por exemplo, triturada, cisalhada, moída, cortada em cubos, picada, macerada ou semelhantes, enquanto em contato, por exemplo, com um tampão, meio ou uma composição de coleta de célula tronco, e o tecido subsequentemente digerido com uma ou mais enzimas. A placenta ou uma porção desta ou cordão umbilical também podem ser fisicamente rompida e digerida com uma ou mais enzimas, e o material resultante depois de imerso em ou misturado dentro, de um tampão, meio ou uma composição de coleta de célula tronco. Qualquer método de rompimento físico pode ser usado, contanto que o método de rompimento leve a uma pluralidade, mais preferivelmente uma maioria, e mais preferivelmente pelo menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % ou 99 % das células no dito órgão viável, como determinado, por exemplo, pela exclusão em azul de tripano.

A placenta ou cordão umbilical podem ser dissecados em componentes antes do rompimento físico e/ou digestão enzimática e recuperação de célula tronco. Por exemplo, células tronco placentárias podem

ser obtidas a partir da membrana amniótica, córion, cotilédones placentários ou qualquer combinação destes ou de uma porção de um cordão umbilical. Em uma forma de realização, células tronco placentárias são obtidas de tecido placentário que compreende âmnio e córion, âmnio-córion ou cordão umbilical. Tipicamente, as células tronco placentárias podem ser obtidas pelo rompimento de um bloco pequeno de tecido placentário ou tecido do cordão umbilical, por exemplo, um bloco de tecido placentário ou tecido do cordão umbilical isto é de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ou cerca de 1000 milímetros cúbicos em volume.

Uma composição de coleta de célula tronco preferida compreende uma ou mais enzima(s) rompedora(s) de tecido. A digestão enzimática preferivelmente usa uma combinação de enzimas, por exemplo, uma combinação de tripsina, collagenase, e/ou dispase, opcionalmente incluindo hialuronidase ou uma combinação de LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, Ind.) e hialuronidase. Outras enzimas que podem ser usadas para romper o tecido da placenta incluem papaína, desoxirribonucleases, serina proteases, tais como tripsina, quimiotripsina ou elastase. As serina proteases podem ser inibidas pela alfa 2 microglobulina no soro e portanto o meio usado para a digestão é usualmente isento de soro. EDTA e DNase são habitualmente usados em procedimentos de digestão enzimática para aumentar a eficiência de recuperação de célula. O digerido é preferivelmente diluído de modo a evitar o aprisionamento de células tronco dentro da digestão viscosa.

Qualquer combinação de enzimas de digestão de tecido pode ser usada. As concentrações típicas para as enzimas de digestão de tecido incluem, por exemplo, 50 a 200 U/ml para a collagenase I e collagenase IV, 1-10 U/ml para a dispase, e de 10 a 100 U/ml para a elastase. As proteases podem ser usadas em combinação, isto é, duas ou mais proteases na mesma

reação de digestão ou podem ser usadas sequencialmente de modo a liberar células tronco placentárias. Por exemplo, em uma forma de realização, uma placenta ou parte desta ou cordão umbilical, são digeridos primeiro com uma quantidade apropriada de colagenase I a 2 mg/ml por 30 minutos, seguida  
 5 pela digestão com tripsina, 0,25 %, por 10 minutos, a 37° C. As serina proteases são preferivelmente usadas consecutivamente a seguir do uso de outras enzimas.

Em uma outra forma de realização, o tecido pode ser rompida ainda pela adição de um quelador, por exemplo, ácido bis(éter 2-aminoetilico)-N,N,N'N'-tetraacético de etileno glicol (EGTA) ou ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) à composição de coleta de célula tronco  
 10 que compreende as células tronco ou a uma solução em que o tecido é rompido e/ou digerido antes da isolamento das células tronco com a composição de coleta de célula tronco.

Será avaliado que onde uma placenta inteira ou porção de uma placenta que compreende células tanto fetais quanto maternas (por exemplo, onde a porção da placenta compreende o córion ou cotilédones), as células tronco placentárias coletadas compreenderão uma mistura de células tronco placentárias derivadas de fontes tanto fetal quanto materna. Onde uma porção  
 15 da placenta que não compreende nenhuma ou um número negligenciável de, células maternas (por exemplo, âmnio), as células tronco placentárias coletadas compreenderão quase exclusivamente células tronco placentárias fetais.

#### 4.3.4 Perfusão Placentária

As células tronco placentárias também podem ser obtidas pela perfusão de uma placenta de mamífero. Métodos de perfusar placenta de mamífero para se obter células tronco são divulgados, por exemplo, em Hariri, Patentes U.S. N<sup>os</sup> 7.045.148 e 7.468.276, e na Publicação do Pedido de Patente U.S. N<sup>o</sup> 2007/0190042, as divulgações das quais são por meio deste  
 25

incorporadas por referência em suas totalidades.

As células tronco placentárias podem ser coletadas pela perfusão, por exemplo, através da vasculatura placentária, usando, por exemplo, uma composição de coleta de célula tronco como uma solução de perfusão. Em uma forma de realização, uma placenta de mamífero é perfusada pela passagem de solução de perfusão através de cada um ou ambas da artéria umbilical e veia umbilical. O fluxo da solução de perfusão através da placenta pode ser realizado usando, por exemplo, fluxo por gravidade dentro da placenta. Preferivelmente, a solução de perfusão é forçada através da placenta usando uma bomba, por exemplo, uma bomba peristáltica. A veia umbilical pode ser, por exemplo, canulada com uma cânula, por exemplo, uma cânula de TEFLON® ou plástica, isto é conectada a um aparelho de conexão estéril, tal como tubulação estéril. O aparelho de conexão estéril é conectado a um tubo de perfusão. Em certas formas de realização, os vasos do cordão umbilical são canulados próximo da placenta, por exemplo, dentro de cerca de 2 a 3 centímetros da placenta; em outras formas de realização, os vasos do cordão umbilical são canulados distal à placenta, por exemplo, dentro de cerca de 2 a 3 centímetros do final do cordão umbilical o mais longe da placenta.

Na preparação para a perfusão, a placenta é preferivelmente orientada (por exemplo, suspensa) em uma tal maneira que a artéria umbilical e a veia umbilical estejam localizadas no ponto mais alto da placenta. A placenta pode ser perfundida pela passagem de um fluido de perfusão, por exemplo, a composição de coleta de célula tronco aqui fornecida, através da vasculatura placentária ou através da vasculatura placentário e tecido circundante. Em uma forma de realização, a artéria umbilical e a veia umbilical são conectadas simultaneamente a uma pipeta isto é conectadas por intermédio de um conector flexível a um reservatório da solução de perfusão. A solução de perfusão é passada dentro da veia e artéria umbilicais. A solução

de perfusão exuda da e/ou passa através das paredes dos vasos sanguíneos dentro dos tecidos circundantes da placenta, e é coletada em um vaso aberto adequado da superfície da placenta que foi ligada ao útero da mãe durante a gestação. A solução de perfusão também pode ser introduzida através da  
5 abertura do cordão umbilical e permitido que flua ou permeie das aberturas na parede da placenta que esteve voltada para a parede uterina materna. Em uma outra forma de realização, a solução de perfusão é passada através das veias umbilicais e coletada da artéria umbilical ou é passada através da artéria umbilical e coletada das veias umbilicais.

10                   Em uma forma de realização, o cordão umbilical proximal é preso durante a perfusão, e mais preferivelmente, é preso dentro de 4 a 5 cm (centímetros) da inserção do cordão no disco placentário.

A primeira coleta de fluido de perfusão de uma placenta de mamífero durante o processo de exsanguinação é no geral colorida com as  
15 células sanguíneas vermelhas residuais do sangue do cordão e/ou sangue placentário. O fluido de perfusão torna-se mais incolor conforme a perfusão prossegue e as células do sangue do cordão residuais são retiradas pela lavagem da placenta. No geral de 30 a 100 ml (mililitros) de fluido de perfusão são adequados para exsanguinar inicialmente a placenta, porém mais  
20 ou menos fluido de perfusão pode ser usado dependendo dos resultados observados.

O volume de líquido de perfusão usado para coletar as células tronco placentárias, pode variar dependendo do número de células tronco a ser coletado, do tamanho da placenta, do número de coletas a serem feitas a partir  
25 de uma única placenta, etc. Em várias formas de realização, o volume de líquido de perfusão pode ser de 50 ml a 5000 ml, 50 ml a 4000 ml, 50 ml a 3000 ml, 100 ml a 2000 ml, 250 ml a 2000 ml, 500 ml a 2000 ml ou 750 ml a 2000 ml. Tipicamente, a placenta é perfundida com 700 a 800 ml de líquido de perfusão a seguir da exsanguinação.

A placenta pode ser perfundida uma pluralidade de vezes durante o curso de diversas horas ou diversos dias. Quando a placenta é para ser perfundida uma pluralidade de vezes, ela pode ser mantida ou cultivada sob condições assépticas em um recipiente ou outro vaso adequado, e perfundida com a composição de coleta de célula tronco ou uma solução de perfusão padrão (por exemplo, uma solução salina normal tal como solução salina tamponada com fosfato (“PBS”)) com ou sem um anticoagulante (por exemplo, heparina, varfarina sódica, coumarina, bishidroxicoumarina), e/ou com ou sem um agente antimicrobiano (por exemplo,  $\beta$ -mercaptoetanol (0,1 mM); antibióticos tais como estreptomicina (por exemplo, de 40 a 100  $\mu$ g/ml), penicilina (por exemplo, a 40 U/ml), anfotericina B (por exemplo, a 0,5  $\mu$ g/ml). Em uma forma de realização, uma placenta isolada é mantida ou cultivada por um período de tempo sem coleta do perfundido, tal que a placenta é mantida ou cultivada por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24 horas ou 2 ou 3 ou mais dias antes da perfusão e coleta do perfundido. A placenta perfundida pode ser mantida por uma ou mais vezes adicionais, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou mais horas, e perfundida uma segunda vez com, por exemplo, 700 a 800 ml de fluido de perfusão. A placenta pode ser perfundida 1, 2, 3, 4, 5 ou mais vezes, por exemplo, uma vez a cada 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 horas. Em uma forma de realização preferida, a perfusão da placenta e a coleta da solução de perfusão, por exemplo, composição de coleta de célula tronco, é repetida até que o número de células nucleadas recuperadas caia abaixo de 100 células/ml. Os perfundidos em pontos de tempo diferentes podem ser processados ainda individualmente para recuperar populações de células dependentes de tempo, por exemplo, células tronco. Os perfundidos de pontos de tempo diferentes também podem ser reunidos.

Sem desejar estar ligado por qualquer teoria, depois da

exsanguinação e um tempo suficiente de perfusão da placenta, acredita-se que as células tronco migrem para dentro da microcirculação exsanguinada e perfundida da placenta e cordão umbilical onde elas são coletadas, preferivelmente pela lavagem em um vaso de coleta pela perfusão. A perfusão da placenta isolada não apenas serve para remover o sangue do cordão residual mas também fornece a placenta com os nutrientes apropriados, incluindo oxigênio. A placenta pode ser cultivada e perfundida com uma solução similar que foi usada para remover as células do sangue do cordão residual, preferivelmente, sem a adição de agentes anticoagulantes.

A perfusão como aqui descrita resulta na coleta de significativamente mais células tronco do que o número obtível de uma placenta de mamífero não perfundida com a dita solução, e não de outro modo tratada para se obter células tronco (por exemplo, pelo rompimento de tecido, por exemplo, digestão enzimática). Neste contexto, “significativamente mais” significa pelo menos 10 % mais. A perfusão produz significativamente mais células tronco do que, por exemplo, o número de células tronco obtíveis do meio de cultura em que uma placenta ou porção desta, foi cultivada.

As células tronco podem ser isoladas da placenta pela perfusão com uma solução que compreende uma ou mais proteases ou outras enzimas rompedoras de tecido. Em uma forma de realização específica, uma placenta ou porção desta (por exemplo, membrana amniótica, âmnio e córion, lóbulo placentário ou cotilédone ou combinação de qualquer um dos precedentes) são levados de 25 a 37° C, e são incubados com uma ou mais enzimas rompedoras de tecido em 200 ml de um meio de cultura por 30 minutos. As células do perfundido são coletadas, levadas a 4° C, e lavadas com uma mistura inibidora fria que compreende 5 mM de EDTA, 2 mM de ditioneitol e 2 mM de beta-mercaptoetanol. As células tronco são lavadas depois de diversos minutos com uma composição de coleta de célula tronco fria (por exemplo, 4° C) aqui descrita em outro lugar.

Será avaliado que a perfusão usando o método pan, isto é, por meio do qual o perfundido é coletado depois que o mesmo é exudado do lado materno da placenta, resulta em uma mistura de células fetais e maternas. Como um resultado, as células coletadas por este método compreendem uma população de células tronco placentárias misturadas de origem tanto fetal quanto materna. Ao contrário, a perfusão somente através da vasculatura placentária, por meio da qual o fluido de perfusão é passado através de um ou dois vasos placentários e é coletado somente através do(s) vaso(s) remanescente(s), resulta na coleta de uma população de células tronco placentárias quase exclusivamente de origem fetal.

#### 4.3.5 Isolação, Classificação e Caracterização de Células Tronco Placentárias

As células tronco da placenta ou cordão umbilical de mamífero, sejam obtidas pela perfusão ou digestão enzimática, podem ser inicialmente purificadas a partir (isto é, ser isoladas a partir de) outras células pelas centrifugação de gradiente Ficoll. Tal centrifugação pode seguir qualquer protocolo padrão para a velocidade de centrifugação, etc. Em uma forma de realização, por exemplo, as células coletadas da placenta ou cordão umbilical são recuperadas do perfundido pela centrifugação a 5000 x g por 15 minutos na temperatura ambiente, o que separa as células, por exemplo, de fragmentos e plaquetas contaminantes. Em uma outra forma de realização, o perfundido placentário é concentrado a cerca de 200 ml, suavemente superposto sobre Ficoll, e centrifugado a cerca de 1100 x g por 20 minutos a 22° C, e as camadas de célula de interface de densidade baixa é coletada para outro processamento.

As pelotas de célula podem ser recolocadas em suspensão em composição de coleta de célula tronco fresca ou um meio adequado para a manutenção da célula tronco, por exemplo, meio isento de soro IMDM contendo 2 U/ml de heparina e 2 mM de EDTA (GibcoBRL, NY). A fração de célula mononuclear total pode ser isolada, por exemplo, usando

Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) de acordo com o procedimento recomendado pelo fabricante.

Como aqui usado, “isolar” células tronco placentárias, significa remover pelo menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % ou 99 % das células com as quais as células tronco estão normalmente associadas na placenta ou cordão umbilical de mamífero intactos. Uma célula tronco de um órgão é “isolada” quando a mesma está presente em uma população de células que compreende menos do que 50 % das células com as quais a célula tronco está normalmente associada no órgão intacto.

As células tronco placentárias obtidas pela perfusão ou digestão, por exemplo, podem ser ainda ou inicialmente, isoladas pela tripsinização diferencial usando, por exemplo, uma solução de 0,05 % de tripisina com 0,2 % de EDTA (Sigma, St. Louis MO). A tripsinização diferencial é possível porque as células tronco placentárias e células tronco do cordão umbilical tipicamente descolam-se das superfícies plásticas dentro de cerca de cinco minutos, ao passo que outras populações aderentes tipicamente requerem mais do que 20 a 30 minutos de incubação. As células descoladas podem ser colhidas a seguir da tripsinização e neutralização da tripisina, usando, por exemplo, Solução Neutralizante de Tripisina (TNS, Cambrex). Em uma forma de realização de isolamento de células aderentes, alíquotas, por exemplo, de cerca de 5 a 10 x 10<sup>6</sup> células são colocadas em cada um de diversos frascos T-75, preferivelmente frascos T75 revestidos com fibronectina. Em uma tal forma de realização, as células podem ser cultivadas com Meio de Crescimento de Célula Tronco Mesenquimatosa (MSCGM) comercialmente disponíveis (Cambrex), e colocadas em um incubador cultura de tecido (37° C, 5 % de CO<sub>2</sub>). Depois de 10 a 15 dias, as células não aderentes são removidas dos frascos pela lavagem com PBS. O PBS é depois substituído pelo MSCGM. Os frascos são preferivelmente examinados

diariamente quanto à presença de vários tipos de células aderentes e em particular, para a identificação e expansão de grupos de células fibroblastóides.

O número e tipo de células coletadas de uma placenta de mamífero podem ser monitorados, por exemplo, medindo-se as mudanças na morfologia e marcadores da superfície de célula usando técnicas de detecção de célula padrão tais como citometria de fluxo, classificação de célula, imunocitoquímica (por exemplo, tingimento com anticorpos específicos de tecido ou específicos de marcador de célula), classificação de célula ativada por fluorescência (FACS), classificação de célula ativada por magnética (MACS), pela examinação da morfologia de células usando microscopia de luz ou confocal, e/ou pela medição de mudanças na expressão de gene usando técnicas bem conhecidas no ramo, tais como PCR e definição do perfil da expressão de gene. Estas técnicas podem ser usadas, também, para identificar células que são positivas para um ou mais marcadores particulares. Por exemplo, usando anticorpos para CD34, pode-se determinar, usando as técnicas acima, se uma célula compreende uma quantidade detectável de CD34; se assim, a célula é CD34<sup>+</sup>. Do mesmo modo, se uma célula produz RNA OCT-4 suficiente para ser detectável pela RT-PCR ou significativamente mais RNA OCT-4 do que uma célula de adulto, a célula é OCT-4<sup>+</sup>. Anticorpos para marcadores da superfície de célula (por exemplo, marcadores CD tais como CD34) e a sequência de genes específicos de célula tronco, tais como OCT-4, são bem conhecidos na técnica.

As células tronco placentárias, por exemplo, células que foram isoladas pela separação Ficoll, aderência diferencial ou uma combinação de ambos, podem ser classificadas usando um classificador de célula ativada por fluorescência (FACS). A classificação de célula ativada por fluorescência (FACS) é um método bem conhecido para separar partículas, incluindo células, com base nas propriedades fluorescentes das partículas (Kamarch,

1987, Methods Enzymol, 151: 150-165). A excitação de laser de porções fluorescentes nas partículas individuais resulta em uma carga elétrica pequena permitindo a separação eletromagnética de partículas positivas e negativas de uma mistura. Em uma forma de realização, os anticorpos ou ligantes  
5 específicos de marcador da superfície de célula são rotulados com rótulos fluorescentes distintos. As células são processadas através do classificador de célula, permitindo a separação de células com base na sua capacidade para ligar-se aos anticorpos usados. As partículas classificadas por FACS podem ser diretamente depositadas em reservatórios individuais de placas de 96  
10 reservatórios ou 384 reservatórios para facilitar a separação e clonagem.

Em um esquema de classificação, as células tronco da placenta ou cordão umbilical são classificados com base na expressão dos marcadores CD34, CD38, CD44, CD45, CD73, CD105, e/ou HLAG; isto é, a ausência de CD34, CD38 e CD45, e a presença de CD44, CD73, CD105 e/ou HLA-G.  
15 Isto pode ser realizado em conexão com procedimentos para selecionar células tronco com base nas suas propriedades de aderência em cultura. Por exemplo, uma seleção de aderência tronco pode ser realizada antes ou depois de classificar com base na expressão de marcador. Em uma forma de realização, por exemplo, as células são classificadas primeiro com base na sua  
20 expressão de CD34; as células CD34<sup>-</sup> são retidas, e células que são, por exemplo, CD200<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup> são separadas de todas as outras células CD34<sup>-</sup>. Em uma outra forma de realização, as células da placenta são fundamentadas na sua expressão de marcadores CD200 e/ou HLA-G; por exemplo, células que demonstram cada um destes marcadores são isoladas para uso mais  
25 adiante. As células que expressam, por exemplo, CD200 e/ou HLA-G, em uma forma de realização específica, podem ser classificadas ainda com base na sua expressão de CD73 e/ou CD105 ou epítomos reconhecidos pelos anticorpos SH2, SH3 ou SH4 ou falta de expressão de CD34, CD38 ou CD45. Por exemplo, em uma forma de realização, as células placentárias e/ou células

do cordão umbilical são classificadas pela expressão ou falta desta, de CD200, HLA-G, CD73, CD105, CD34, CD38 e CD45, e células que são CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> e CD45<sup>-</sup> são isoladas de outras células para uso mais adiante.

5                    Em uma outra forma de realização, pérolas magnéticas podem ser usadas para separar células. As células podem ser classificadas usando uma técnica de classificação de célula ativada por magnética (MACS), um método para separar partículas com base na sua capacidade para ligar pérolas magnéticas (0,5 a 100 µm de diâmetro). Uma variedade de modificações úteis  
10 pode ser realizada nas microesferas magnéticas, incluindo adição covalente de anticorpo que especificamente reconhece uma molécula da superfície da célula particular ou hapteno. As pérolas são depois misturadas com as células para permitir a ligação. As células são depois passadas através de um campo magnético para separar as células tendo o marcador de superfície da célula específico. Em uma forma de realização, estas células depois de isoladas e re-  
15 misturadas com pérolas magnéticas podem ser ligadas a um anticorpo contra marcadores da superfície de célula adicionais. As células são mais uma vez passadas através de um campo magnético, isolando-se as células que ligam ambos os anticorpos. Tais células podem ser depois diluídas em placas  
20 separadas, tais como placas de microtítulo para a isolamento clonal.

As células tronco placentárias também podem ser caracterizadas e/ou classificadas com base na morfologia e características de crescimento da célula. Por exemplo, as células tronco placentárias podem ser caracterizadas como tendo, e/ou selecionadas com base, por exemplo, em uma  
25 aparência fibroblastóide em cultura. As células tronco placentárias também podem ser caracterizadas como tendo, e/ou ser selecionadas, com base na sua capacidade para formar corpos como embrióide. Em uma forma de realização, por exemplo, as células placentárias ou células do cordão umbilical que são fibroblastóides na forma, expressam CD73 e CD105, e produzem um ou mais

corpos como embrióide em cultura são isoladas de outras células placentárias ou células do cordão umbilical. Em uma outra forma de realização, células placentárias OCT-4<sup>+</sup> que produzem um ou mais corpos como embrióide em cultura são isoladas de outras células placentárias.

5                   As células tronco placentárias podem ser avaliadas quanto a viabilidade, potencial de proliferação, e longevidade usando técnicas padrão conhecidas no ramo, tais como ensaio de exclusão do azul de tripano, ensaio de captação de diacetato de fluoresceína, ensaio de captação de iodeto de propídio (para avaliar a viabilidade); e ensaio de captação de timidina, ensaio  
10 de proliferação de célula MTT (para avaliar a proliferação). A longevidade pode ser determinada pelos métodos bem conhecidos na técnica, tais como pela determinação do número máximo de população que duplica em uma cultura extensiva.

                  As células tronco placentárias também podem ser separadas de  
15 outras células usando outras técnicas conhecidas no ramo, por exemplo, crescimento seletivo de células desejadas (seleção positiva), destruição seletiva de células indesejadas (seleção negativa); separação com base na aglutinabilidade diferencial da célula na população misturada como, por exemplo, com aglutinina de feijão de soja; procedimentos de congelamento-  
20 descongelamento; filtração; centrifugação convencional e zonal; elutriação centrífuga (centrifugação de contra-fluxo); separação de gravidade unitária; distribuição de contra-corrente; eletroforese; e outros.

#### 4.4 CULTURA DE CÉLULAS TRONCO PLACENTÁRIAS

##### 4.4.1 Meio de Cultura

25                   As células tronco placentárias isoladas ou populações de células tronco placentárias ou tecido placentário ou tecido do cordão umbilical a partir das quais as células tronco crescem, podem ser usadas para iniciar ou semear, culturas de célula. As células são no geral transferidas para vasos de cultura de tecido estéreis não revestidos ou revestidos com matriz

extracelular ou ligantes tais como laminina, colágeno (por exemplo, nativo ou desnaturado), gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina, e proteína de membrana extracelular (por exemplo, MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, Mass.)).

5                   As células tronco placentárias podem ser cultivadas em qualquer meio, e sob quaisquer condições, reconhecida na técnica como aceitáveis para a cultura de células tronco. Preferivelmente, o meio de cultura compreende soro. As células tronco placentárias podem ser cultivadas, por exemplo, em DMEM-LG (Meio Essencial Modificado de Dulbecco, baixa glicose)/MCDB 201 (meio basal de fibroblasto de pintinho) contendo ITS (insulina-transferrina-selênio), LA+BSA (ácido linoléico-albumina sérica bovina), dextrose, ácido L-ascórbico, PDGF, EGF, IGF-1, e penicilina/estreptomicina; DMEM-HG (alta glicose) que compreende 10 % de soro bovino fetal (FBS); DMEM-HG que compreende 15 % de FBS; IMDM 10 (meio de Dulbecco modificado de Iscove) que compreende 10 % de FBS, 10 % de soro de cavalo, e hidrocortisona; M199 que compreende 10 % de FBS, EGF, e heparina;  $\alpha$ -MEM (meio essencial mínimo) que compreende 10 % de FBS, GlutaMAX<sup>®</sup> e gentamicina; DMEM que compreende 10 % de FBS, GlutaMAX<sup>®</sup> e gentamicina, etc. Um meio preferido é DMEM-LG/MCDB- 20 201 que compreende 2% de FBS, ITS, LA+BSA, dextrose, ácido L-ascórbico, PDGF, EGF, e penicilina/estreptomicina.

Outros meios que podem ser usados para a cultura de células tronco placentárias incluem DMEM (alta ou baixa glicose), meio basal de Eagle, meio F10 de Ham (F10), meio F-12 de Ham (F12), meio de Dulbecco 25 modificado de Iscove, Meio de Crescimento de Célula Tronco Mesenquimatosa (MSCGM), meio L-15 de Liebovitz, MCDB, DMIEM/F12, RPMI 1640, DMEM avançado (Gibco), DMEM/ MCDB201 (Sigma), e CELL-GRO FREE.

O meio de cultura pode ser suplementado com um ou mais

componentes incluindo, por exemplo, soro (por exemplo, soro bovino fetal (FBS), preferivelmente cerca de 2 a 15 % (v/v); soro equino (cavalo) (ES); soro humano (HS)); beta-mercaptoetanol (BME), preferivelmente cerca de 0,001 % (v/v); um ou mais fatores de crescimento, por exemplo, fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), fator de crescimento 1 equivalente à insulina (IGF-1), fator inibidor de leucemia (LIF), fator de crescimento de fibroblasto vascular (VEGF), e eritropoietina (EPO); aminoácidos, incluindo L-valina; e um ou mais agentes antibióticos e/ou antimicóticos para controlar a contaminação microbiana, tal como, por exemplo, penicilina G, sulfato de estreptomicina, anfotericina B, gentamicina, e nistatina, sozinhos ou em combinação.

#### 4.4.2 Expansão e Proliferação de Células Tronco Placentárias

Uma vez que uma célula tronco placentária ou população isolada de células tronco (por exemplo, uma célula tronco ou população de células tronco separadas de pelo menos 50 % das células placentárias com as quais a célula tronco ou população de células tronco estão normalmente associadas in vivo) são isoladas, a célula tronco ou população de células tronco podem ser proliferadas e expandidas in vitro. Por exemplo, uma população de células tronco placentárias pode ser cultivada em recipientes de cultura de tecido, por exemplo, cápsulas, frascos, placas de reservatório múltiplo ou semelhantes, por um tempo suficiente para as células tronco proliferarem até 70 a 90 % de confluência, isto é, até que as células tronco e a sua progênie ocupem 70 a 90 % da área de superfície de cultura do recipiente de cultura de tecido.

As células tronco placentárias podem ser semeadas em vasos de cultura a uma densidade que permite o crescimento de célula. Por exemplo, as células podem ser semeadas em baixa densidade (por exemplo, cerca de 1.000 a cerca de 5.000 células/cm<sup>2</sup>) até a alta densidade (por exemplo, cerca

de 50.000 ou mais células/cm<sup>2</sup>). Em uma forma de realização preferida, as células são cultivadas em cerca de 0 a cerca de 5 por cento em volume de CO<sub>2</sub> em ar. Em algumas formas de realização preferidas, as células são cultivadas em cerca de 2 a cerca de 25 por cento de O<sub>2</sub> no ar, preferivelmente de cerca de 5 a cerca de 20 por cento de O<sub>2</sub> no ar. As células preferivelmente são cultivadas em cerca de 25°C a cerca de 40°C, preferivelmente 37°C. As células são preferivelmente cultivadas em um incubador. O meio de cultura pode ser estático ou agitado, por exemplo, usando um biorreator. As células tronco placentárias preferivelmente são cultivadas sob baixo estresse oxidativo (por exemplo, com adição de glutathione, ácido ascórbico, catalase, tocoferol, N-acetilcisteína ou semelhante).

Uma vez que 70% a 90% de confluência são obtidos, as células podem ser passadas. Por exemplo, as células podem ser enzimaticamente tratadas, por exemplo, tripsinizadas, usando técnicas bem conhecidas no ramo, para separá-las da superfície da cultura de tecido. Depois de remover as células por pipetagem e contar as células, cerca de 10.000 a 100.000 células tronco por centímetro quadrado, preferivelmente cerca de 50.000 células tronco por centímetro quadrado, são passadas para um novo recipiente de cultura contendo meio de cultura fresco. Tipicamente, os novos meios são o mesmo tipo de meio do qual as células tronco foram removidas. São aqui fornecidas populações de células tronco placentárias que foram passadas pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 ou 20 vezes ou mais, e combinações das mesmas.

#### 4.4.3 Populações de Célula Tronco Placentária

Os métodos de tratamento aqui fornecidos, em certas formas de realização, usam populações de células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias. As populações de célula tronco placentária podem ser isoladas diretamente de uma ou mais placentas; isto é, a população de célula tronco placentária podem ser uma população de células placentárias ou

células do cordão umbilical, que compreendem células tronco placentárias ou células do cordão umbilical, obtidas de ou contidas dentro de perfundido ou obtidas de ou contidas dentro de digerido (isto é, a coleta de células obtidas pela digestão enzimática de uma placenta ou parte desta ou de um cordão umbilical). As células tronco placentárias isoladas também podem ser cultivadas e expandidas para produzir populações de célula tronco placentária. As populações de células placentárias ou células do cordão umbilical que compreendem células tronco placentárias também podem ser cultivadas e expandidas para produzir populações de célula tronco placentária.

Em várias formas de realização, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 99% das células em uma população de célula placentária isolado ou população de célula do cordão umbilical são células tronco placentárias. Isto é, uma população de célula placentário ou população de célula do cordão umbilical que compreende células tronco placentárias podem compreender, por exemplo, tanto quanto 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% de células não tronco.

São aqui fornecidos métodos de produzir populações de célula tronco placentária isoladas, por exemplo, pela seleção de células tronco placentárias ou células tronco do cordão umbilical, sejam derivadas da digestão enzimática ou perfusão, que expressam marcadores particulares e/ou características de cultura ou morfológicas particulares. Em uma forma de realização, por exemplo, uma população de célula pode ser produzida por um método que compreende selecionar células placentário ou do cordão umbilical que (a) aderem a um substrato plástico de cultura de tecido, (b) são CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, e CD105<sup>+</sup>; e isolando-se as ditas células de outras células para formar uma população de célula. Em uma outra forma de realização, por exemplo, uma população de célula pode ser produzida por um método que compreende selecionar células placentárias ou do cordão umbilical que (a) aderem a um

substrato, e (b) expressam CD200 e HLA-G; e isolando-se as ditas células de outras células para formar uma população de célula. Em uma outra forma de realização, o método de produzir uma população de célula compreende selecionar células placentárias ou células do cordão umbilical que (a) aderem a um substrato, e (b) expressam CD73, CD105, e CD200; e isolando-se as ditas células de outras células para formar uma população de célula. Em uma outra forma de realização, o método de produzir uma população de célula compreende selecionar as células placentárias ou células do cordão umbilical que (a) aderem a um substrato e (b) expressam CD200 e OCT-4; e isolando-se as ditas células de outras células para formar uma população de célula. Em uma outra forma de realização, o método de produzir uma população de célula compreende selecionar células placentárias ou células do cordão umbilical que (a) aderem a um substrato, (b) expressam CD73 e CD105, e (c) facilitam a formação de um ou mais corpos como embrióide em uma população de células placentárias que compreende a dita célula tronco quando a dita população é cultivada sob condições que permitem a formação de um corpo como embrióide; e isolando-se as ditas células de outras células para formar uma população de célula. Em uma outra forma de realização, o método de produzir uma população de célula compreende selecionar células placentárias ou células do cordão umbilical que (a) aderem a um substrato, e (b) expressam CD73, CD105 e HLA-G; e isolando-se as ditas células de outras células para formar uma população de célula. Em uma outra forma de realização, o método de produzir uma população de célula compreende selecionar células placentárias que (a) aderem a um substrato, (b) expressam OCT-4, e (c) facilitam a formação de um ou mais corpos como embrióide em uma população de células placentárias que compreende a dita célula tronco quando a dita população é cultivada sob condições que permitem a formação de um corpo como embrióide; e isolando-se as ditas células de outras células para formar uma população de célula. Em qualquer uma das formas de

realização acima, o método pode adicionalmente compreender selecionar células placentárias ou células do cordão umbilical que expressam ABC-p (uma proteína transportadora ABC específica da placenta; ver, por exemplo, Allikmets et al., *Cancer Res.* 58(23): 5337-9 (1998)).

5 Nas formas de realização acima, o substrato pode ser qualquer superfície na qual a cultura e/ou seleção de células, por exemplo, células tronco placentárias, podem ser realizadas. Tipicamente, o substrato é plástico, por exemplo, cápsula de cultura de tecido ou placa de reservatório múltiplo plástica. O plástico de cultura de tecido pode ser revestido com uma  
10 biomolécula, por exemplo, laminina ou fibronectina.

As células, por exemplo, as células tronco placentárias, podem ser selecionadas para uma população de célula tronco placentária por qualquer meio conhecido na técnica de seleção de célula. Por exemplo, as células podem ser selecionadas usando um anticorpo ou anticorpos a um ou mais  
15 marcadores da superfície de célula, por exemplo, na citometria de fluxo ou FACS. A seleção pode ser realizada usando anticorpos em conjunção com pérolas magnéticas. Os anticorpos que são específicos para certos marcadores relacionados com a célula tronco são conhecidos na técnica. Por exemplo, anticorpos para OCT-4 (Abcam, Cambridge, MA), CD200 (Abcam), HLA-G  
20 (Abcam), CD73 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), CD105 (Abcam; BioDesign InterNational, Saco, ME), etc. Anticorpos para outros marcadores também são comercialmente disponíveis, por exemplo, CD34, CD38 e CD45 são disponível, por exemplo, da StemCell Technologies ou BioDesign InterNational.

25 As populações de célula tronco placentária isoladas podem ser combinadas com uma ou mais populações de células não tronco ou células não placentárias. Por exemplo, uma população isolada de células tronco placentárias pode ser combinada com sangue (por exemplo, sangue placentário ou sangue do cordão umbilical), células tronco derivadas do

sangue (por exemplo, células tronco derivadas de sangue placentário ou sangue do cordão umbilical), populações de células nucleadas derivadas do sangue, células mesenquimatosas derivadas da medula óssea, populações de célula tronco derivadas do osso, medula óssea bruta, células tronco adultas (somáticas), populações de células tronco contidas dentro de tecido, células tronco cultivadas, populações de células totalmente diferenciadas (por exemplo, condrócitos, fibroblastos, células amnióticas, osteoblastos, células musculares, células cardíacas, etc.) e outras. As células em uma população de célula placentária isolada podem ser combinadas com células de um outro tipo em razões de cerca de 100.000.000:1, 50.000.000:1, 20.000.000:1, 10.000.000:1, 5.000.000:1, 2.000.000:1, 1.000.000:1, 500.000:1, 200.000:1, 100.000:1, 50.000:1, 20.000:1, 10.000:1, 5.000:1, 2.000:1, 1.000:1, 500:1, 200:1, 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 1:100; 1:200; 1:500; 1:1.000; 1:2.000; 1:5.000; 1:10.000; 1:20.000; 1:50.000; 1:100.000; 1:500.000; 1:1.000.000; 1:2.000.000; 1:5.000.000; 1:10.000.000; 1:20.000.000; 1:50.000.000; ou cerca de 1:100.000.000, comparando os números de células nucleadas totais em cada população. As células em uma população de célula placentária isolada também pode ser combinada com células de uma pluralidade de tipos de células.

Em uma forma de realização, uma população isolada de células tronco placentárias é combinada com células tronco hematopoiéticas. Tais células tronco hematopoiéticas podem estar, por exemplo, contidas dentro de sangue placentário, do cordão umbilical não processados ou sangue periférico; em células nucleadas totais de sangue placentário, sangue do cordão umbilical ou sangue periférico; em uma população isolada de células CD34<sup>+</sup> do sangue, por exemplo, sangue do cordão umbilical ou sangue periférico; na medula óssea não processada; em células nucleadas totais da medula óssea; em uma população isolada de células CD34<sup>+</sup> da medula óssea ou semelhantes.

#### 4.5 PRESERVAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO PLACENTÁRIAS

As células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, podem ser preservadas, isto é, colocadas sob condições que permitem a armazenagem de longa duração ou condições que inibam a morte da célula, por exemplo, pela apoptose ou necrose.

As células podem ser preservadas usando, por exemplo, uma composição que compreenda um inibidor de apoptose, inibidor de necrose e/ou um perfluorocarbono que carregue oxigênio, como descrito no pedido de patente publicado U.S. US 2007/0190042. Em uma forma de realização, uma população de células tronco placentárias é preservada contatando-se a população com uma composição de coleta de célula tronco que compreende um inibidor da apoptose e um perfluorocarbono que carrega oxigênio, em que o dito inibidor de apoptose está presente em uma quantidade e por um tempo suficiente para reduzir ou prevenir a apoptose na população de células tronco, quando comparada a uma população de células tronco não contatada com o inibidor de apoptose. Em uma forma de realização específica, o dito inibidor de apoptose é um inibidor da caspase. Em uma outra forma de realização específica, o dito inibidor de apoptose é um inibidor de JNK. Em uma forma de realização mais específica, o dito inibidor de JNK não modula a diferenciação ou proliferação das células tronco placentárias. Em uma outra forma de realização, a dita composição de coleta de célula tronco compreende o dito inibidor de apoptose e o dito perfluorocarbono que carrega oxigênio em fases separadas. Em uma outra forma de realização, a dita composição de coleta de célula tronco compreende o dito inibidor de apoptose e o dito perfluorocarbono que carrega oxigênio em uma emulsão. Em uma outra forma de realização, a composição de coleta de célula tronco adicionalmente compreende um emulsificador, por exemplo, lecitina. Em uma outra forma de realização, o dito inibidor de apoptose e o dito perfluorocarbono estão entre cerca de 0°C e cerca de 25°C no momento de contato com as células tronco.

Em uma outra forma de realização mais específica, o dito inibidor de apoptose e o dito perfluorocarbono estão entre cerca de 2°C e 10°C ou entre cerca de 2°C e cerca de 5°C, no momento de contato com as células tronco. Em uma outra forma de realização mais específica, o dito contato é realizado durante o transporte da dita população de células tronco. Em uma outra forma de realização mais específica, o dito contato é realizado durante o congelamento e descongelamento da população de células tronco placentárias.

Em uma outra forma de realização, as populações de células tronco placentárias podem ser preservadas por um método que compreende contatar a população com um inibidor de apoptose e um composto de preservação de órgão, em que o dito inibidor de apoptose está presente em uma quantidade e por um tempo suficiente para reduzir ou prevenir a apoptose na população de células, por exemplo, células tronco placentárias, quando comparadas a uma população de células não contatada com o inibidor de apoptose. Em uma forma de realização específica, o composto de preservação de órgão é solução de UW (descrita na Patente U.S. Nº 4.798.824; também conhecido como ViaSpan; ver também Southard et al., Transplantation 49(2): 251-257 (1990)) ou uma solução descrita em Stern et al., Patente U.S. Nº 5.552.267. Em uma outra forma de realização, o dito composto de preservação de órgão é hidroxietil amido, ácido lactobiônico, rafinose ou uma combinação destes. Em uma outra forma de realização, a composição de coleta de célula tronco adicionalmente compreende um perfluorocarbono que carrega oxigênio, em duas fases ou como uma emulsão.

Em uma outra forma de realização do método, as células tronco placentárias são contatadas com uma composição de coleta de célula tronco que compreende um inibidor de apoptose e perfluorocarbono que carrega oxigênio, composto de preservação de órgão ou combinação destes, durante a perfusão. Em uma outra forma de realização, as células são contatada durante um processo de rompimento de tecido, por exemplo,

digestão enzimática. Em uma outra forma de realização, as células tronco placentárias são contatadas com o dito composto de coleta de célula tronco depois da coleta pela perfusão ou depois da coleta pelo rompimento de tecido, por exemplo, digestão enzimática.

5                   Tipicamente, durante a coleta, enriquecimento e isolamento de célula placentária ou do cordão umbilical, é preferível minimizar ou eliminar o estresse celular devido à hipoxia e estresse mecânico. Em uma outra forma de realização do método, portanto, as células tronco placentárias são expostas a uma condição hipóxica durante a coleta, enriquecimento ou isolamento por  
10 menos do que seis horas durante a dita preservação, em que uma condição hipóxica é uma concentração de oxigênio que é menor do que a concentração de oxigênio normal do sangue. Em uma forma de realização mais específica, as células tronco placentárias são expostas à dita condição hipóxica por menos do que duas horas durante a dita preservação. Em uma outra forma de  
15 realização mais específica, as células tronco placentárias são expostas à dita condição hipóxica por menos do que uma hora ou menos do que trinta minutos ou não são expostas a uma condição hipóxica, durante a coleta, enriquecimento ou isolamento. Em uma outra forma de realização específica, as células tronco placentárias não são expostas ao estresse de cisalhamento  
20 durante a coleta, enriquecimento ou isolamento.

As células tronco placentárias aqui descritas podem ser criopreservadas, por exemplo, em meio de criopreservação em recipientes pequenos, por exemplo, ampolas. O meio de criopreservação adequado inclui, mas não é limitado ao meio de cultura incluindo, por exemplo, meio de  
25 crescimento ou meio de congelamento de célula, por exemplo meio de congelamento de célula comercialmente disponível, por exemplo, meio designado C2695, C2639 ou C6039 (Sigma). O meio de criopreservação preferivelmente compreende DMSO (sulfóxido de dimetila), em uma concentração, por exemplo, de cerca de 10% (v/v). O meio de criopreservação

pode compreender agentes adicionais, por exemplo, Plasmalyte, metilcelulose e/ou glicerol. As células tronco placentárias são preferivelmente esfriadas a cerca de 1°C/min durante a criopreservação. Uma temperatura de criopreservação preferida é de cerca de -80°C a cerca de -180°C, preferivelmente de cerca de -125°C a cerca de -140°C. As células criopreservadas podem ser transferidas para nitrogênio líquido antes de descongelar para o uso. Em algumas formas de realização, por exemplo, uma vez que as ampolas atingiram cerca de -90°C, elas são transferidas para uma área de armazenagem em nitrogênio líquido. As células criopreservadas preferivelmente são descongeladas a uma temperatura de cerca de 25°C a cerca de 40°C, preferivelmente a uma temperatura de cerca de 37°C.

#### 4.6 COMPOSIÇÕES QUE COMPREENDEM CÉLULAS TRONCO PLACENTÁRIAS

Os métodos aqui fornecidos, por exemplo, podem usar composições que compreendem células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias. Os exemplos não limitantes, representativos de tais composições são aqui fornecidos.

##### 4.6.1.1 Células Criopreservadas

As células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, e populações de células tronco placentárias, por exemplo, criopreservadas para uso posterior. Os métodos para a criopreservação de células, tais como células tronco, são bem conhecidos na técnica. As populações de célula tronco placentária podem ser preparadas em uma forma que seja facilmente administrável a um indivíduo. Por exemplo, as células tronco placentárias podem estar contidas dentro de um recipiente que seja adequado para o uso médico. Um tal recipiente pode ser, por exemplo, um bolsa, frasco, botija ou outro recipiente plásticos estéreis dos quais a população de células tronco placentárias podem ser facilmente dispensadas. Por exemplo, o recipiente pode ser uma bolsa de sangue ou outro saco

plástico, medicamento aceitável adequado para a administração intravenosa de um líquido a um receptor. O recipiente é preferivelmente um que permita a criopreservação da população de célula combinada.

As populações de células tronco placentárias criopreservadas podem compreender células placentárias ou células do cordão umbilical derivadas de um único doador ou de doadores múltiplos. A população de células tronco placentárias pode ser completamente compatíveis com HLA para um receptor pretendido ou parcial ou completamente não compatível com HLA.

Assim, em uma forma de realização, é aqui fornecida uma composição que compreende uma população de células tronco placentárias em um recipiente. Em uma forma de realização específica, a população de célula é criopreservada. Em uma outra forma de realização específica, o recipiente é um bolsa, frasco ou botija. Em forma de realização mais específica, a dita bolsa é uma bolsa plástica estéril. Em uma forma de realização mais específica, a dita bolsa é adequada para, permite ou facilita a administração intravenosa da dita população de célula placentária. A bolsa pode compreender lúmens ou compartimentos múltiplos que são interconectados para permitir a mistura das células tronco placentárias e uma ou mais outras soluções, por exemplo, um medicamento, antes ou durante a administração. Em uma outra forma de realização específica, a composição compreende um ou mais compostos que facilitam a criopreservação da população de célula. Em uma outra forma de realização específica, a dita população de célula placentária está contida dentro de uma solução aquosa fisiologicamente aceitável. Em uma forma de realização mais específica, a dita solução aquosa fisiologicamente aceitável é uma solução a 0,9% de NaCl. Em uma outra forma de realização específica, a dita população de célula placentária compreende células tronco placentárias que são compatíveis com o HLA de um receptor da dita população de célula. Em uma outra forma de

realização específica, a dita população de célula compreende células tronco placentárias que são pelo menos parcialmente não compatíveis com o HLA de um receptor. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células tronco placentárias são derivadas de uma pluralidade de doadores.

#### 5 4.6.1.2 Composições Farmacêuticas

As populações de células tronco placentárias isoladas ou populações de células que compreendem as células tronco placentárias isoladas, podem ser formuladas em composições farmacêuticas para o uso in vivo, por exemplo, nos métodos de tratamento aqui fornecidos. Tais  
10 composições farmacêuticas compreendem uma população de células tronco placentárias isoladas ou uma população de células que compreendem células tronco placentárias isoladas, em um carregador farmacêuticamente aceitável, por exemplo, uma solução salina ou outra solução fisiologicamente aceitável aprovada para a administração in vivo. As composições farmacêuticas que  
15 compreendem as células tronco placentárias isoladas aqui descritas podem compreender qualquer uma ou qualquer combinação, das populações de células tronco placentárias isoladas ou células tronco placentárias isoladas, aqui descritas em outro lugar. As composições farmacêuticas podem compreender células isoladas fetais, maternas ou tanto fetais quanto maternas.  
20 As composições farmacêuticas aqui fornecidos podem compreender ainda células tronco placentárias isoladas obtidas de um único indivíduo, cordão umbilical ou placenta ou de uma pluralidade de indivíduos, cordões umbilicais ou placentas. Qualquer uma das células tronco placentárias, aqui descritas em outro lugar, podem ser formuladas em composição farmacêutica,  
25 como descrito abaixo.

As composições farmacêuticas aqui fornecidas podem compreender qualquer número de células tronco placentárias isoladas. Por exemplo, uma única dose unitária de células tronco placentárias isoladas pode compreender, em várias formas de realização, cerca de, pelo menos ou não

mais do que  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$  ou mais células isoladas.

As composições farmacêuticas aqui fornecidas compreendem populações de células que compreendem 50% de células viáveis ou mais (isto é, pelo menos 50% das células na população são funcionais ou vivas). Preferivelmente, pelo menos 60% das células na população são viáveis. Mais preferivelmente, pelo menos 70%, 80%, 90%, 95% ou 99% das células na população na composição farmacêutica são viáveis.

As composições farmacêuticas aqui fornecidas podem compreender um ou mais compostos que, por exemplo, facilitam o enxerto (por exemplo, anticorpos anti-receptor de célula T, um imunossupressor ou semelhante); estabilizantes tais como albumina, dextrano 40, gelatina, hidroxietil amido, plasmalyte, e outros.

Quando formulado como uma solução injetável, em uma forma de realização, a composição farmacêutica compreende cerca de 1% a 1,5% de HSA e cerca de 2,5% de dextrano. Em uma forma de realização preferida, a composição farmacêutica compreende de cerca de  $5 \times 10^6$  células por mililitro a cerca de  $2 \times 10^7$  células per mililitro em uma solução que compreende 5% de HSA e 10% de dextrano, opcionalmente compreendendo um imunossupressor, por exemplo, ciclosporina A, por exemplo, em 10 mg/kg.

Em outras formas de realização, a composição farmacêutica, por exemplo, uma solução, compreende uma pluralidade de células, por exemplo, células tronco placentárias isoladas, em que a dita composição farmacêutica compreende entre cerca de  $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$  células por mililitro a cerca de  $5,0 \pm 1,5 \times 10^6$  células per mililitro. Em outras formas de realização, a composição farmacêutica compreende entre cerca de  $1,5 \times 10^6$  células por mililitro a cerca de  $3,75 \times 10^6$  células por mililitro. Em outras formas de realização, a composição farmacêutica compreende entre cerca de  $1 \times 10^6$

células/ml e cerca de  $50 \times 10^6$  células/ml, de cerca de  $1 \times 10^6$  células/ml a cerca de  $40 \times 10^6$  células/ml, de cerca de  $1 \times 10^6$  células/ml a cerca de  $30 \times 10^6$  células/ml, de cerca de  $1 \times 10^6$  células/ml a cerca de  $20 \times 10^6$  células/ml, de cerca de  $1 \times 10^6$  células/ml a cerca de  $15 \times 10^6$  células/ml ou de cerca de  $1 \times 10^6$  células/ml a cerca de  $10 \times 10^6$  células/ml. Em certas formas de realização, a composição farmacêutica não compreende nenhum grumo de célula visível (isto é, nenhum macro grumos de célula) ou substancialmente nenhum de tais grumos visíveis. Como aqui usado, "macro grumos de célula" significa uma agregação de células visíveis sem ampliação, por exemplo, visíveis ao olho nu, e no geral refere-se a uma agregação de célula maior do que cerca de 150 microns. Em algumas formas de realização, a composição farmacêutica compreende cerca de 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0%, 8,5%, 9,0%, 9,5% ou 10% de dextrano, por exemplo, dextrano-40. Em uma forma de realização específica, a dita composição compreende cerca de 7,5% a cerca de 9% de dextrano-40. Em uma forma de realização específica, a dita composição compreende cerca de 5,5% de dextrano-40. Em certas formas de realização, a composição farmacêutica compreende de cerca de 1% a cerca de 15% de albumina sérica humana (HSA). Em formas de realização específicas, a composição farmacêutica compreende cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6,5%, 7,5%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% ou 15% de HSA. Em uma forma de realização específica, as ditas células foram criopreservadas e descongeladas. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células foram filtradas através de um filtro de 70  $\mu$ M a 100  $\mu$ M. Em uma outra forma de realização específica, a dita composição não compreende nenhum grumo de célula visível. Em uma outra forma de realização específica, a dita composição compreende menos do que cerca de 200 grumos de célula por  $10^6$  células, em que os ditos grumos de célula são visíveis apenas sob um microscópio, por exemplo, um microscópio de luz. Em uma outra forma de realização específica, a dita

composição compreende menos do que cerca de 150 grumos de célula por  $10^6$  células, em que os ditos grumos de célula são visíveis apenas sob um microscópio, por exemplo, um microscópio de luz. Em uma outra forma de realização específica, a dita composição compreende menos do que cerca de 100 grumos de célula por  $10^6$  células, em que os ditos grumos de célula são visíveis apenas sob um microscópio, por exemplo, um microscópio de luz.

Em uma forma de realização específica, a composição farmacêutica compreende cerca de  $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$  células por mililitro, cerca de 5,5% de dextrano-40 (p/v), cerca de 10% de HSA (p/v), e cerca de 5% de DMSO (v/v).

Em outras formas de realização, a composição farmacêutica compreende uma pluralidade de células, por exemplo, uma pluralidade de células tronco placentárias isoladas em uma solução que compreende 10% de dextran-40, em que a composição farmacêutica compreende entre cerca de  $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$  células por mililitro a cerca de  $5,0 \pm 1,5 \times 10^6$  células por mililitro, e em que a dita composição não compreende nenhum grumo de célula visível com o olho nu (isto é, não compreende nenhum macro grumo de célula). Em algumas formas de realização, a composição farmacêutica compreende entre cerca de  $1,5 \times 10^6$  células por mililitro a cerca de  $3,75 \times 10^6$  células por mililitro. Em uma forma de realização específica, as ditas células foram criopreservadas e descongeladas. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células foram filtradas através de um filtro de 70  $\mu$ M a 100  $\mu$ M. Em uma outra forma de realização específica, a dita composição compreende menos do que cerca de 200 micro grumos de célula (isto é, grumos de célula visíveis apenas com ampliação) por  $10^6$  células. Em uma outra forma de realização específica, a composição farmacêutica compreende menos do que cerca de 150 micro grumos de célula por  $10^6$  células. Em uma outra forma de realização específica, a composição farmacêutica compreende menos do que cerca de 100 micro grumos de célula per  $10^6$  células. Em uma

outra forma de realização específica, a composição farmacêutica compreende menos do que 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3% ou 2% de DMSO ou menos do que 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2% ou 0,1% de DMSO.

5                    Além disso, são aqui fornecidas composições que compreendem células, em que as ditas composições são produzidas por um dos métodos aqui divulgados. Por exemplo, em uma forma de realização, a composição farmacêutica compreende células, em que a composição farmacêutica é produzida por um método que compreende filtrar uma solução  
10                    que compreende células tronco placentárias para formar uma solução contendo célula filtrada; diluir a solução contendo célula filtrada com uma primeira solução a cerca de 1 a  $50 \times 10^6$ , 1 a  $40 \times 10^6$ , 1 a  $30 \times 10^6$ , 1 a  $20 \times 10^6$ , 1 a  $15 \times 10^6$  ou 1 a  $10 \times 10^6$  células por mililitro, por exemplo, antes da criopreservação; e diluir a solução contendo célula filtrada resultante com  
15                    uma segunda solução que compreende dextrano, mas não compreendendo albumina sérica humana (HSA) para produzir a dita composição. Em certas formas de realização, a dita diluição é até não mais do que cerca de  $15 \times 10^6$  células por mililitro. Em certas formas de realização, a dita diluição é até não mais do que cerca de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro. Em certas formas de  
20                    realização, a dita diluição é até não mais do que cerca de  $7,5 \times 10^6$  células por mililitro. Em outras certas formas de realização, se a solução contendo célula filtrada, antes da diluição, compreende menos do que cerca de  $15 \times 10^6$  células por mililitro, a filtração é opcional. Em outras certas formas de realização, se a solução contendo célula filtrada, antes da diluição,  
25                    compreende menos do que cerca de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro, a filtração é opcional. Em outras certas formas de realização, se a solução contendo célula filtrada, antes da diluição, compreende menos do que cerca de  $7,5 \times 10^6$  células por mililitro, a filtração é opcional.

Em uma forma de realização específica, as células são

criopreservadas entre a dita diluição com uma primeira solução de diluição e a dita diluição com a dita segunda solução de diluição. Em uma outra forma de realização específica, a primeira solução de diluição compreende dextrano e HSA. O dextrano na primeira solução de diluição ou segunda solução de diluição pode ser dextrano de qualquer peso molecular, por exemplo, dextrano tendo um peso molecular de cerca de 10 kDa a cerca de 150 kDa. Em algumas formas de realização, o dito dextrano na dita primeira solução de diluição ou dita segunda solução é de cerca de 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0%, 8,5%, 9,0%, 9,5% ou 10% de dextrano. Em uma outra forma de realização específica, o dextrano na dita primeira solução de diluição ou dita segunda solução de diluição é dextrano-40. Em uma outra forma de realização específica, o dextrano na dita primeira solução de diluição e dita segunda solução de diluição é dextrano-40. Em uma outra forma de realização específica, o dito dextrano-40 na dita primeira solução de diluição é 5,0% de dextrano-40. Em uma outra forma de realização específica, o dito dextrano-40 na dita primeira solução de diluição é 5,5% de dextrano-40. Em uma outra forma de realização específica, o dito dextrano-40 na dita segunda solução de diluição é 10% de dextrano-40. Em uma outra forma de realização específica, o dito HSA na dita solução que compreende HSA é de 1 a 15% de HSA. Em uma outra forma de realização específica, o dito HSA na dita solução que compreende HSA é de cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% ou 15% de HSA. Em uma outra forma de realização específica, o dito HSA na dita solução que compreende HSA é 10% de HSA. Em uma outra forma de realização específica, a dita primeira solução de diluição compreende HSA. Em uma forma de realização mais específica, o dito HSA na dita primeira solução de diluição é 10% de HSA. Em uma outra forma de realização específica, a dita primeira solução de diluição compreende um crioprotetor. Em uma forma de realização mais específica, o dito crioprotetor é DMSO. Em uma outra forma de realização

específica, o dito dextrano-40 na dita segunda solução de diluição é de cerca de 10% de dextrano-40. Em uma outra forma de realização específica, a dita composição que compreende células compreende cerca de 7,5% a cerca de 9% de dextrano. Em uma outra forma de realização específica, a composição farmacêutica compreende de cerca de  $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$  células por mililitro a cerca de  $5,0 \pm 1,5 \times 10^6$  células por mililitro. Em uma outra forma de realização específica, a composição farmacêutica compreende de cerca de  $1,5 \times 10^6$  células por mililitro a cerca de  $3,75 \times 10^6$  células por mililitro.

Em uma outra forma de realização, a composição farmacêutica é fabricada por um método que compreende (a) filtrar uma solução contendo célula que compreende células tronco placentárias antes da criopreservação para produzir uma solução contendo célula filtrada; (b) criopreservar as células na solução contendo célula filtrada em cerca de 1 a  $50 \times 10^6$ , 1 a  $40 \times 10^6$ , 1 a  $30 \times 10^6$ , 1 a  $20 \times 10^6$ , 1 a  $15 \times 10^6$  ou 1 a  $10 \times 10^6$  células por mililitro; (c) descongelar as células; e (d) diluir a solução contendo célula filtrada de cerca de 1:1 a cerca de 1:11 (v/v) com uma solução de dextrano-40. Em certas formas de realização, se o número de células é menor do que cerca de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro antes da etapa (a), a filtração é opcional. Em uma forma de realização mais específica, as células na etapa (b) são criopreservadas a cerca de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro. Em uma forma de realização mais específica, as células na etapa (b) são criopreservadas em uma solução que compreende cerca de 5% a cerca de 10% de dextrano-40 e HSA. Em certas formas de realização, a dita diluição na etapa (b) é até não mais do que cerca de  $15 \times 10^6$  células por mililitro.

Em uma outra forma de realização, a composição farmacêutica é fabricada por um método que compreende: (a) colocar em suspensão as células tronco placentárias em uma solução a 5,5% de dextrano-40 que compreende 10% de HSA para formar uma solução contendo célula; (b) filtrar a solução contendo célula através de um filtro de 70  $\mu$ M; (c) diluir a

solução contendo célula com uma solução que compreende 5,5% de dextrano-40, 10% de HSA, e 5% de DMSO a cerca de 1 a  $50 \times 10^6$ , 1 a  $40 \times 10^6$ , 1 a  $30 \times 10^6$ , 1 a  $20 \times 10^6$ , 1 a  $15 \times 10^6$  ou 1 a  $10 \times 10^6$  células por mililitro; (d) criopreservar as células; (e) descongelar as células; e (f) diluir a solução  
 5 contendo célula de 1:1 a 1:11 (v/v) com 10% de dextrano-40. Em certas formas de realização, a dita diluição na etapa (c) é até não mais do que cerca de  $15 \times 10^6$  células por mililitro. Em certas formas de realização, a dita diluição na etapa (c) é até não mais do que cerca de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células/ml. Em certas formas de realização, a dita diluição na etapa (c) é até não mais do  
 10 que cerca de  $7,5 \times 10^6$  células/ml.

Em uma outra forma de realização, a composição que compreende células é fabricada por um método que compreende: (a) centrifugar uma pluralidade de células, por exemplo, células tronco placentárias, para coletar as células; (b) recolocar em suspensão as células em  
 15 5,5% de dextrano-40; (c) centrifugar as células para coletar as células; (d) recolocar em suspensão as células em uma solução a 5,5% de dextrano-40 que compreende 10% de HSA; (e) filtrar as células através de um filtro de  $70 \mu\text{M}$ ; (f) diluir as células em 5,5% de dextrano-40, 10% de HSA, e 5% de DMSO a cerca de 1 a  $50 \times 10^6$ , 1 a  $40 \times 10^6$ , 1 a  $30 \times 10^6$ , 1 a  $20 \times 10^6$ , 1 a  $15 \times 10^6$  ou 1  
 20 a  $10 \times 10^6$  células por mililitro; (g) criopreservar as células; (h) descongelar as células; e (i) diluir as células 1:1 a 1:11 (v/v) com 10% de dextrano-40. Em certas formas de realização, a dita diluição na etapa (f) é até não mais do que cerca de  $15 \times 10^6$  células por mililitro. Em certas formas de realização, a dita diluição na etapa (f) é até não mais do que cerca de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células/ml.  
 25 Em certas formas de realização, a dita diluição na etapa (f) é até não mais do que cerca de  $7,5 \times 10^6$  células/ml. Em outras certas formas de realização, se o número de células é menor do que cerca de  $10 \pm 3 \times 10^6$  células por mililitro, a filtração é opcional.

As composições, por exemplo, composições farmacêuticas que

compreendem as células placentárias isoladas, aqui descritas pode compreender qualquer uma das células tronco placentárias isoladas aqui descritas.

5 Outras formulações injetáveis, adequadas para a administração de produtos celulares, podem ser usadas.

Em uma forma de realização, a composição farmacêutica compreende células tronco placentárias isoladas que são substancial ou completamente, não maternas na origem, isto é, têm o genótipo fetal; por exemplo, pelo menos cerca de 90%, 95%, 98%, 99% ou cerca de 100% não  
10 são maternas na origem.

Em uma forma de realização específica, a composição farmacêutica adicionalmente compreende uma célula tronco que não é obtida de uma placenta.

As células tronco placentárias isoladas nas composições, por exemplo, composições farmacêuticas, aqui fornecidas, podem compreender células tronco placentárias derivadas de um único doador ou de doadores múltiplos. As células placentárias isoladas podem ser completamente compatíveis com o HLA para um receptor pretendido ou parcial ou completamente não compatíveis com o HLA.

#### 20 4.6.1.3 Meio Condicionado de Célula Tronco Placentária

As células placentárias, por exemplo, células tronco placentárias, aqui fornecidas podem ser usadas para produzir meio condicionado. Em várias formas de realização, o meio condicionado compreende meio em que as células tronco placentárias foram cultivadas por  
25 pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou mais dias. Em outras formas de realização, o meio condicionado compreende meio em que as células tronco placentárias foram cultivadas até pelo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% de confluência ou até 100% de confluência. Em uma outra forma de realização, o meio condicionado compreende meio em que as

células tronco placentárias e não placentárias, células tronco que não do cordão umbilical foram cultivadas.

#### 4.6.2 Banco de Célula Placentária

Células, por exemplo, células tronco placentárias, de placentas e/ou cordões umbilicais após o parto podem ser cultivadas em vários modos diferentes para produzir um conjunto de lotes, por exemplo, um conjunto de doses individualmente administráveis, de células tronco placentárias. Tais lotes, por exemplo, podem ser obtidas a partir de células tronco de perfundido placentário ou perfundido de cordão umbilical ou de tecido placentário ou tecido do cordão umbilical digeridos por enzima. Conjuntos de lotes de células tronco placentárias, obtidos de uma ou uma pluralidade de placentas, podem ser organizados em um banco de células, por exemplo, para a armazenagem de longa duração. No geral, as células tronco aderentes são obtidas a partir de uma cultura inicial de material placentário ou de cordão umbilical para formar uma cultura de semente, por exemplo, de células tronco placentárias, isto é expandidas sob condições controladas para formar populações de células de números aproximadamente equivalentes de duplicatas. Os lotes são preferivelmente derivados do tecido de uma única placenta ou cordão umbilical, mas pode ser derivado do tecido de uma pluralidade de placentas.

Em uma forma de realização, os lotes de célula tronco são obtidos como segue. O tecido é primeiro rompido, por exemplo, picando-se, digerido-se com uma enzima adequada, por exemplo, colagenase (ver a Seção 5.2.3, acima). O tecido preferivelmente compreende, por exemplo, o âmnio inteiro, córion inteiro, ambos ou um cordão umbilical de uma única placenta, mas pode compreender apenas uma parte do âmnio, córion ou cordão umbilical. O tecido digerido é cultivado, por exemplo, por cerca de 1 a 3 semanas, preferivelmente cerca de 2 semanas. Depois da remoção de células não aderentes, colônias de alta densidade que se formam são coletadas, por

exemplo, pela tripsinação. Estas células são coletadas e recolocadas em suspensão em um volume conveniente de meio de cultura, e definidas como células da Passagem 0.

As células da Passagem 0 são depois usadas para semear  
 5 culturas de expansão. As culturas de expansão podem ser qualquer arranjo de aparelhos de cultura de célula separados, por exemplo, uma Fabrica de célula pelo NUNC®. As células na cultura de Passagem 0 podem ser subdivididas em qualquer grau de modo a semear culturas de expansão com, por exemplo,  
 10  $1 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $4 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $6 \times 10^3$ ,  $7 \times 10^3$ ,  $8 \times 10^3$ ,  $9 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $7 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$ ,  $9 \times 10^4$  ou  $10 \times 10^4$  células tronco. Preferivelmente, de cerca de  $1 \times 10^3$  a cerca de  $1 \times 10^4$  células da Passagem 0 por centímetro quadrado são usadas para semear cada cultura de expansão. O número de culturas de expansão pode depender do número de células da Passagem 0, e pode ser maior ou menor em número  
 15 dependendo da placenta(s) particular(es) da(s) qual(is) as células tronco são obtidas.

As culturas de expansão são cultivadas até que a densidade de células em cultura atinge um certo valor, por exemplo, de cerca de  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. As células podem ser coletadas e criopreservadas neste ponto ou  
 20 passagem em novas culturas de expansão como descrito acima. As células podem ser passadas, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 vezes antes do uso. Um registro do número acumulativo de duplicatas de população é preferivelmente mantido durante a(s) cultura(s) de expansão. As células de uma cultura da Passagem 0 podem ser expandidas  
 25 por 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 ou 40 duplicações ou até 60 duplicações. Preferivelmente, entretanto, o número de duplicações da população, antes de dividir a população de células em doses individuais, está entre cerca de 15 e cerca de 30 duplicações. As células podem ser cultivadas continuamente por todo o processo de expansão

ou podem ser congeladas em um ou mais pontos durante a expansão.

As células a serem usadas para as doses individuais podem ser congeladas, por exemplo, criopreservadas para uso posterior. As doses individuais podem compreender, por exemplo, cerca de 1 milhão a cerca de 50 milhões de células por ml, e podem compreender entre cerca de  $10^6$  e cerca de  $10^{10}$  células no total.

Em uma forma de realização, portanto, um banco de célula de células tronco placentárias pode ser feito por um método que compreende: expandir as células tronco placentárias da cultura primária de uma placenta ou cordão umbilical humanos após o parto para uma primeira pluralidade de duplicações da população; criopreservar as ditas células tronco placentárias para formar um Banco de Célula Master; expandir uma pluralidade de células tronco placentárias do Banco de Célula Master para uma segunda pluralidade de duplicações da população; criopreservar as células tronco placentárias para formar um Banco de Célula de Trabalho; expandir uma pluralidade de células tronco placentárias do Banco de Célula de Trabalho para uma terceira pluralidade de duplicações da população; e criopreservar as células tronco placentárias em doses individuais, em que as ditas doses individuais coletivamente compõem um banco de célula tronco placentária.

Em uma outra forma de realização específica, a cultura de células primárias compreende células tronco placentárias de perfundido placentário. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células da cultura primária compreendem células tronco placentárias de tecido placentário digerido. Em uma outra forma de realização específica, as ditas células da cultura primária compreendem células tronco placentárias de perfundido placentário e de tecido placentário digerido. Em uma outra forma de realização específica, todas as ditas células tronco placentárias na dita cultura primária são da mesma placenta. Em uma outra forma de realização específica, o método compreende ainda a etapa de selecionar células tronco

placentárias CD200<sup>+</sup> da dita pluralidade de células do dito Banco de Célula de Trabalho para formar doses individuais. Em uma outra forma de realização específica, as ditas doses individuais compreendem de cerca de  $10^4$  a cerca de  $10^5$  células tronco placentárias. Em uma outra forma de realização específica, as ditas doses individuais compreendem de cerca de  $10^5$  a cerca de  $10^6$  células tronco placentárias. Em uma outra forma de realização específica, as ditas doses individuais compreendem de cerca de  $10^6$  a cerca de  $10^7$  células tronco placentárias. Em uma outra forma de realização específica, as ditas doses individuais compreendem de cerca de  $10^7$  a cerca de  $10^8$  células tronco placentárias. Em uma outra forma de realização específica, as ditas doses individuais compreendem de cerca de  $10^8$  a cerca de  $10^9$  células tronco placentárias. Em uma outra forma de realização específica, as ditas doses individuais compreendem de cerca de  $10^9$  a cerca de  $10^{10}$  células tronco placentárias.

Em uma forma de realização preferida, o doador da qual a placenta é obtida (por exemplo, a mãe) é testado quanto a pelo menos um patógeno. Se os testes da mãe dão positivos para um patógeno testado, o lote inteiro da placenta é descartado. Tal teste pode ser realizado em qualquer tempo durante a produção dos lotes de célula tronco placentária, incluindo antes ou depois do estabelecimento das células Passagem 0 ou durante a cultura de expansão. Os patógenos para os quais a presença é testada podem incluir, sem limitação, hepatite A, hepatite B, hepatite C, hepatite D, hepatite E, vírus da imunodeficiência humana (tipos I e II), citomegalovírus, vírus do herpes, e outros.

## 5. EXEMPLOS

### 5.1 EXEMPLO 1: TRATAMENTO DE DOENÇAS, DISTÚRBIOS OU CONDIÇÕES DO PULMÃO USANDO CÉLULAS TRONCO PLACENTÁRIAS

Este Exemplo fornece regimes de tratamento de exemplo para

doenças, distúrbios ou condições do pulmão.

#### 5.1.1 Tratamento de Lesão Pulmonar Aguda

Um indivíduo apresenta-se com uma lesão pulmonar aguda devido a inalação de fumaça. O indivíduo é administrado com  $1 \times 10^8$  a  $5 \times 10^9$  células tronco placentárias  $CD10^+CD34^-CD105^+CD200^+$  em uma solução a 0,9% de NaCl intravenosamente. O indivíduo é monitorado durante as duas semanas subsequentes para avaliar a redução em um ou mais dos sintomas, incluindo um aumento no volume respiratório forçado (FEV). O indivíduo é monitorado durante o curso do ano seguinte, e as células tronco placentárias na mesma dose são administradas como necessário.

#### 5.1.2 Tratamento de um Distúrbio Pulmonar Intersticial

Um indivíduo apresenta-se com sintomas incluindo falta de ar, tosse não produtiva, e evidência de hemorragia em um pulmão. Um diagnóstico de doença pulmonar intersticial é feito. O indivíduo é administrado com  $5 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$  células tronco placentárias  $CD10^+CD34^-CD105^+CD200^+$  em uma solução a 0,9% de NaCl intravenosamente. O indivíduo é monitorado durante os 100 dias seguintes quanto à melhora detectável, como determinado pela espirometria ou outra medição do volume respiratório forçado (FEV). O indivíduo é opcionalmente também avaliado em um ou mais de um raio X do tórax, varredura de CT ou MRI para determinar se a hemorragia melhorou.

#### 5.1.3 Profilaxia de um Distúrbio Pulmonar Associado com a Doença do Enxerto Versus Hospedeiro

Um indivíduo aguardando um transplante de medula óssea alogênico é administrado com  $5 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$  células tronco placentárias  $CD10^+CD34^-CD105^+CD200^+$  em solução a 0,9% de NaCl intravenosamente dentro de 24 horas antes do transplante de medula óssea. A administração das células é repetida dentro de 24 horas depois do transplante de medula óssea. O indivíduo é monitorado durante os 100 dias seguintes, e é administrado com

uma dose de 5 a  $10 \times 10^8$  células tronco placentárias  $CD10^+CD34^-CD105^+CD200^+$  se GVHD se desenvolve e progride além do Grau I.

#### 5.1.4 Tratamento de um Distúrbio Pulmonar Causado pela Doença do Enxerto Versus Hospedeiro

5 Um indivíduo que recebeu um transplante de medula óssea alogênico apresenta-se com bronquiolite obliterativa e doença do enxerto versus hospedeiro Grau III. O indivíduo é administrado com  $5 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$  células tronco placentárias  $CD10^+CD34^-CD105^+CD200^+$  em solução a 0,9% de NaCl intravenosamente dentro de 24 horas da apresentação, e o indivíduo é

10 monitorado diariamente por uma semana pela espirometria para determinar a melhora na respiração. Se a respiração não é substancialmente melhorada dentro de 4 a 7 dias depois da administração inicial, como avaliada em pelo menos uma melhora de 10% no volume respiratório forçado ( $FEV_1$ ) ou capacidade vital forçada (FVC) ou uma melhora da razão  $FEV_1/FVC$  até pelo

15 menos 80%, a administração das células é repetida. O indivíduo é opcionalmente administrado com um ou mais de um esteróide inalado, um esteróide oral ou azitromicina (por exemplo, 250 mg uma vez ao dia por aproximadamente 3 meses após a apresentação) além das células tronco placentárias. O indivíduo é monitorado durante os 100 dias seguintes, e é

20 administrado com uma dose de reforço de  $5 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$  células tronco placentárias  $CD10^+CD34^-CD105^+CD200^+$  em qualquer tempo se GVHD de Grade III ou piora retornam ou se  $FEV_1$  ou FVC diminuem em qualquer tempo em 10% ou mais ou se a razão  $FEV_1/FVC$  cai para  $< 70\%$ .

#### 5.1.5 Tratamento de um Distúrbio Pulmonar Causado pela Doença do Enxerto Versus Hospedeiro

25 Um indivíduo que recebeu um transplante de fígado apresenta-se com bronquiolite obliterativa e doença do enxerto versus hospedeiro Grade III. O indivíduo é administrado com  $2 \times 10^8$  a  $8 \times 10^8$  células tronco placentárias  $CD10^+CD34^-CD105^+CD200^+$  em solução a 0,9% de NaCl

intravenosamente (dia 0); uma segunda administração é dada 7 dias mais tarde. O indivíduo é monitorado diariamente entre as doses, e por 7 dias depois, pela espirometria para determinar a melhora na respiração. Se a respiração não é substancialmente melhorada dentro de 4 a 7 dias depois da  
 5 segunda administração, como avaliada em pelo menos uma melhora de 10% no volume respiratório forçado ( $FEV_1$ ) ou capacidade vital forçada (FVC) ou uma melhora da razão  $FEV_1/FVC$  até pelo menos 75% ou se a GVHD não diminui até o Grau II ou mais baixo, a administração das células é repetida, e o indivíduo é administrado com um ou mais de um esteróide inalado, um  
 10 esteróide oral ou azitromicina (por exemplo, 250 mg uma vez ao dia por aproximadamente 3 meses após a apresentação) além das células tronco placentárias. O indivíduo é monitorado durante os 100 dias seguintes, e é administrado com uma dose de reforço de  $5 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$  células tronco placentárias  $CD10^+CD34^+CD105^+CD200^+$  em qualquer tempo se GVHD de  
 15 Grau III ou pior retorna ou se  $FEV_1$  ou FVC diminuem em qualquer tempo em 10% ou mais ou se a razão  $FEV_1/FVC$  cai para  $< 70\%$ .

#### 5.1.6 Tratamento de Distúrbios Pulmonares Associados Com Artrite Reumatóide

Um indivíduo apresenta-se com artrite reumatóide com  
 20 envolvimento do pulmão. O indivíduo é administrado com  $1$  a  $5 \times 10^8$  células tronco placentárias  $CD10^+CD34^+CD105^+CD200^+$  em solução a 0,9% de NaCl intravenosamente. Ao indivíduo é dado metotrexato em uma dosagem padrão e monitorado quanto a redução na inflamação pulmonar.

Um segundo indivíduo apresenta-se com artrite reumatóide  
 25 com envolvimento do pulmão. O envolvimento do pulmão é em parte devido à administração de metotrexato. A terapia com metotrexato é parado, e o indivíduo é administrado com uma combinação de células tronco placentárias não modificadas e células tronco placentárias que foram modificadas para produzir um polipeptídeo de fusão que compreende IL-1Ra e DHFR, em que

os dois tipos de células tronco são administrados em uma razão 1:1. As células engendradas e não engendradas são  $1 \text{ a } 5 \times 10^8$  células tronco placentárias  $\text{CD10}^+\text{CD34}^-\text{CD105}^+\text{CD200}^+$  em solução a 0,9% de NaCl. O indivíduo é monitorado quanto a redução na inflamação pulmonar.

#### 5 5.1.7 Tratamento de um Distúrbio Pulmonar Associado com SLE

Um indivíduo apresenta-se com pneumonite e vasculite dos pulmões, além de febre, fraqueza, artralgia (dor nas juntas), diplopia (visão dupla), estrabismo e hipoestesia em ambas as mãos e pés, microhematuria (quantidade detectável de sangue na urina), hipocomplementemia e títulos  
 10 altos de anticorpos autoimunes. Um diagnóstico de lupo eritematoso sistêmico (SLE) é feito. O indivíduo é refratário à pulsoterapia com metilprednisolona, e à ciclofosfamida. O indivíduo é administrado  $1 \times 10^9$  a  $5 \times 10^9$  células tronco placentárias  $\text{CD10}^+\text{CD34}^-\text{CD105}^+\text{CD200}^+$  em uma solução a 0,9% de NaCl intravenosamente, e é administrado com uma segunda dose 7 dias mais  
 15 tarde. O indivíduo é monitorado durante os 30 a 100 dias seguintes quanto a redução na função pulmonar, como indicado pela redução no volume respiratório forçado ( $\text{FEV}_1$ ) ou capacidade vital forçada (FVC) ou uma redução da razão  $\text{FEV}_1/\text{FVC}$ . Dada a condição do indivíduo, a administração de células tronco placentárias é considerada eficaz se qualquer um destes  
 20 indicadores não pioram.

#### 5.1.8 Tratamento de um Distúrbio Pulmonar Associado Com IBD

Um indivíduo, anteriormente diagnosticado com doença do intestino inflamatório (IBD), apresenta-se com dispnéia não associada com sulfasalazina ou ácido 5-aminossalicílico. Outras causas da dispnéia (por  
 25 exemplo, alergias, asma, e outros) foram rejeitadas. O indivíduo é ainda refratário aos esteróides orais e terapia imunossupressiva. Na dúvida o indivíduo tem envolvimento pulmonar de IBD, o indivíduo é administrado com  $5 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$  células tronco placentárias  $\text{CD10}^+\text{CD34}^-\text{CD105}^+\text{CD200}^+$  em uma solução a 0,9% de NaCl intravenosamente. O

indivíduo é monitorado durante os 7 a 14 dias seguintes quanto à melhora na dispnéia, como avaliada em uma melhora de pelo menos 10% no volume respiratório forçado (FEV<sub>1</sub>) ou capacidade vital forçada (FVC) ou uma melhora da razão FEV<sub>1</sub>/FVC a pelo menos 75%.

#### 5 5.1.9 Tratamento de um Distúrbio Pulmonar Associado com Escleroderma

Um indivíduo, anteriormente diagnosticado com escleroderma, apresenta-se com envolvimento pulmonar diagnosticado como doença pulmonar intersticial, como evidenciado pela redução na capacidade respiratória única de difusão para monóxido de carbono (DLCO) comparada com normal, confirmado pela presença de linfócitos e eosinófilos na lavagem broncoalveolar. O indivíduo é administrado com  $5 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$  células tronco placentárias CD10<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup> em uma solução a 0,9% de NaCl intravenosamente. O indivíduo é monitorado durante os 30 a 100 dias seguintes quanto a qualquer melhora detectável na DLCO, dispnéia e/ou a presença de linfócitos e eosinófilos na lavagem broncoalveolar; qualquer redução é uma indicação de que a administração das células tronco placentárias é eficaz.

#### 5.1.10 Tratamento de doença pulmonar intersticial

Um indivíduo apresenta-se com dispnéia, perda de peso, tosse seca, improdutiva, e uma razão FEV<sub>1</sub>/FVC de < 80%. Um diagnóstico de doença pulmonar intersticial (ILD) é feito. Porque a causa da doença pulmonar não é evidente, a doença pulmonar é caracterizada como idiopática. O indivíduo é administrado com  $5 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$  células tronco placentárias CD10<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup> em uma solução a 0,9% de NaCl intravenosamente. O indivíduo é monitorado pelo menos uma vez ao mês por um ano quanto a qualquer melhora detectável ou diminuição da piora, no volume respiratório forçado (FEV<sub>1</sub>) ou capacidade vital forçada (FVC) ou uma redução da razão FEV<sub>1</sub>/FVC. A administração de células tronco placentárias é considerada eficaz se qualquer um destes indicadores não

pioram. Se a piora de qualquer um destes parâmetros ocorre, o indivíduo é administrado com uma dose de reforço no mesmo nível como a dose inicial.

Um segundo indivíduo apresenta-se com dispnéia, perda de peso, tosse seca, não produtiva, e uma razão  $FEV_1/FVC$  de  $< 80\%$ . Um diagnóstico de doença pulmonar intersticial (ILD) é feito. A ILD é aparentemente devido à exposição recente ao asbesto, como confirmado pela história de trabalho, crepitações inspiratórias secas, e um raio X do tórax mostrando placas acima do diafragma. O indivíduo é administrado com  $5 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$  células tronco placentárias  $CD10^+CD34^-CD105^+CD200^+$  em uma solução a 0,9% de NaCl intravenosamente, opcionalmente em combinação com um corticosteróide oral. O indivíduo é monitorado pelo menos uma vez ao mês pelo resto da vida do indivíduo quanto a qualquer melhora detectável ou diminuição da piora, no volume respiratório forçado ( $FEV_1$ ) ou capacidade vital forçada (FVC) ou uma redução da razão  $FEV_1/FVC$ . Dada a condição do indivíduo, a administração de células tronco placentárias é considerada eficaz se qualquer um destes indicadores não pioram. Se a piora de qualquer um destes parâmetros ocorre, o indivíduo é administrado com uma dose de reforço no mesmo nível como a dose inicial.

#### 5.1.11 Tratamento de doença pulmonar intersticial

Um indivíduo apresenta-se com dispnéia, tosse persistente, e uma ampliação do peito (hiperaeração). O indivíduo mostra uma razão de  $FEV_1/FVC$  de  $< 60\%$  mesmo com terapia broncodilatadora. Com base na história do indivíduo como um fumante, um diagnóstico de doença pulmonar obstrutiva crônica (enfizema) é feito. O indivíduo é administrado com  $5 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$  células tronco placentárias  $CD10^+CD34^-CD105^+CD200^+$  em uma solução a 0,9% de NaCl intravenosamente, opcionalmente em combinação com um broncodilatador tal como albuterol e um corticosteróide inalado. O indivíduo é monitorado pela espirometria pelo menos uma vez ao mês durante o resto da vida do indivíduo quanto a qualquer melhora detectável ou

diminuição da piora, no volume respiratório forçado ( $FEV_1$ ) ou capacidade vital forçada (FVC) ou uma redução da razão  $FEV_1/FVC$ . Dada a condição do indivíduo, a administração de células tronco placentárias é considerada eficaz se qualquer um destes indicadores não pioram.

## 5 5.2 EXEMPLO 2: LOCALIZAÇÃO ESPECÍFICA DE PULMÃO DE CÉLULAS TRONCO PLACENTÁRIAS

A biodistribuição de células tronco placentárias foi avaliada em camundongos imunocomprometidos.

Em um estudo piloto, as células tronco placentárias  
 10  $CD10^+CD34^-CD105^+CD200^+$  foram administrados como uma única e/ou repetida injeção na cauda intravenosa a camundongos NOD-SCID tanto machos quanto fêmeas e C57BL/10SgSnAi-Rag2(tmi) $\gamma$ c(tmi) fêmeas ou machos (Taconic Farms, Germantown, Nova Iorque). Os camundongos foram sacrificados em 4, 14, 28 ou 47 dias após o tratamento e as amostras de  
 15 pulmão, fígado, coração, rins, baço, glândulas adrenais, medula óssea, e cérebro foram processadas e analisadas pela Q-PCR. A seguir da administração IV, DNA humano foi detectado em DNA total isolado de amostras de pulmão, cérebro, coração e/ou fígado em camundongos que foram sacrificados 4 dias após a dose. Os níveis mais altos de DNA foram  
 20 detectados no pulmão. Os resultados indicaram que a biodistribuição de células tronco placentárias foi primariamente limitada ao pulmão no Dia 4 após o tratamento. O DNA humano não foi detectado em amostras de tecido de camundongo sacrificados em 14, 28 ou 47 dias após o tratamento.

Um segundo estudo foi realizado em que os camundongos  
 25 dosados com células tronco placentárias como uma dose única ou doses IV repetidas nos dias 1, 4 e 7 foram avaliados quanto a biodistribuição e persistência das células tronco placentárias pela detecção do gene da transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT). Os camundongos foram sacrificados em 4 e 24 horas a seguir da primeira dose IV de células tronco

placentárias assim como 4 horas após a dose no dia 7 (3ª dose repetida) e nos dias 37 e 92. O DNA humano foi detectado em 4 horas após a dose nos tecidos mais testados incluindo a maioria das amostras de pulmão, sítio de injeção, fígado, baço, e coração, indicando distribuição inicial de células aos órgãos com fluxo sanguíneo mais alto. Em 24 horas após a dose, entretanto, apenas o tecido pulmonar compativelmente abrigou o DNA humano, ao passo que os outros tecidos exceto os sítios de injeção e uma amostra de cérebro foram depurados do DNA humano. Em 7 dias após a dose, apenas pulmão e um pequeno número de sítios de injeção foram ainda positivos quanto ao DNA humano. No dia 37, apenas uma única amostra de tecido pulmonar foi fracamente positiva quanto ao DNA humano. Nenhum DNA humano foi detectado em qualquer um dos tecidos de qualquer um dos animais avaliados no dia 92. Depois de injeções IV repetidas de  $1 \times 10^6$  células/ camundongo, as células tronco placentárias foram detectadas nos mesmos tecidos em 4 horas depois da terceira injeção como foram detectadas em 4 horas depois de uma única injeção IV, e todos os tecidos foram completamente limpos de DNA humano no dia 92.

### 5.3 EXEMPLO 3: ANÁLISE DE CÉLULAS TRONCO PLACENTÁRIAS EM UM MODELO DE BLEOMICINA DE CAMUNDONGOS C57BL/6

Este Exemplo fornece estudos que demonstram a eficácia de células tronco placentárias no tratamento de doença fibrótica pulmonar. Neste exemplo, as células tronco placentárias são CD34<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> expandidas em cultura, células aderentes ao plástico de cultura de tecido da placenta. As células são cariotipicamente normais depois da expansão, e são fornecidas em uma concentração de aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células/ml.

#### Estudo Usando Camundongos

A bleomicina é um medicamento citostático habitualmente utilizado no tratamento de câncer. A administração de bleomicina tipicamente resulta em inflamação pulmonar crônica que pode progredir para fibrose.

Como tal, a administração de bleomicina aos animais experimentais é um modelo aceito de fibrose pulmonar em seres humanos.

Oitenta e quatro camundongos C57CL6 machos, 6 semanas de idade e pesando 20 a 22 gramas, são aclimatizados por 72 horas, depois designados em doze a um de sete grupos diferentes: (1) administração de solução salina (controle negativo); (2) bleomicina; (3) solução salina +  $1,5 \times 10^6$  células tronco placentárias; (4) bleomicina + veículo; (5) bleomicina +  $1,5 \times 10^6$  células tronco placentárias; (6) bleomicina (em solução a 0,9% de NaCl) +  $1,5 \times 10^6$  fibroblastos dérmicos humanos normais (NHDFs); e (7) bleomicina + pirfenidona. Bleomicina, solução salina, e células são administradas intravenosamente na veia da cauda em 400  $\mu$ l de solução. Pirfenidona é administrada oralmente 400 mg/kg/dia em 0,5% de carboximetil-celulose. Dentro de cada grupo, seis camundongos são mortos no dia 10 após a administração, e os 6 restantes são mortos no dia 21 após a administração.

Os resultados das administrações são avaliadas pela lavagem broncoalveolar (BAL) e imunoistoquímica. Os níveis de TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , fator de crescimento de tecido conectivo (CTGF), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento de queratinócito (KGF), fator de crescimento de hepatócito (HGF), níveis de interleucina-13 (IL-13), IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-8 em fluido de BAL e homogenado de pulmão são determinados pelo ELISA ou metodologia comparável.

Para a imunoistoquímica, os lóbulos pulmonares são perfundidos com formalina + um coquetel inibidor de fosfatase. O grau de deposição de colágeno é analisada em parte pela medição da quantidade de hidroxiprolina no tecido pulmonar. Em resumo, os pulmões são homogeneizados em 5 ml de solução salina, e digerido em 2 ml de HCl 6 N por 16 horas a 110°C. A seguir da neutralização com NaOH até o pH 7, um ml de reagente de Cloramina T a 0,5 mol/L é depois adicionado e deixado

reagir na temperatura ambiente por 20 minutos. 1 ml de ácido perclórico a 3,15 N e P-dimetilaminobenzaldeído são depois adicionados a cada amostra e incubados por 20 minutos a 65°C. As amostras são esfriadas por 10 minutos, depois de lidas a 557 nm em um espectrofotômetro usando concentrações de trans-24-hidróxi-L-prolina de 0 a 5 mg/ml como uma curva padrão. As quantidades mais altas de hidroxiprolina indicam quantidades mais alta de deposição de colágeno. Ver Krishna, G., et al. Am. J. Path. 158: 997-1004 (2001).

Histopatologia inclui exame de tecidos pulmonares quanto a evidência de fibrose ou locais fibróticos. As células tronco placentárias são identificadas pelo tingimento com um anticorpo específico para vimentina humana.

A eficácia das células tronco placentárias é estabelecida por uma demonstração de um nível mais baixo de qualquer citocina relacionada com a inflamação comparado com os controles de bleomicina ou um nível significativamente mais baixo de hidroxiprolina em homogenados pulmonares na presença de células tronco placentárias comparados com os controles de bleomicina.

#### Estudo Usando Ratos

Sessenta ratos SD® machos (Charles River Laboratories), idade de 7 a 8 semanas e pesando aproximadamente 176 a 225 g, são divididos em cinco grupos: (1) dosagem intratraqueal de veículo (solução a 0,9% de NaCl) seguida em 15 minutos pela dosagem intravenosa de veículo; (2) dosagem intratraqueal de veículo seguida em 15 minutos pela dosagem intravenosa de  $4,0 \times 10^6$  células de células tronco placentárias em 800 µl de solução; (3) dosagem intratraqueal de bleomicina (por exemplo, BLENOXANE®, 3 unidades por kg) seguida em 15 minutos pela dosagem intravenosa de veículo; (4) dosagem intratraqueal de bleomicina (3 unidades por kg) seguida em 15 minutos pela dosagem intravenosa de  $1,0 \times 10^6$  células

de células tronco placentárias em 800 µl de solução; e (5) dosagem intratraqueal de bleomicina (3 unidades por kg) seguida em 15 minutos pela dosagem intravenosa de  $4,0 \times 10^6$  células de células tronco placentárias em 800 µl de solução.

5                   Depois de 15 dias, os animais são avaliados quanto aos vários parâmetros fisiológicos. Todos os animais são avaliados quanto ao peso corporal. O sangue (0,2 ml) é coletado de todos os animais via a veia jugular e analisado quanto aos gases periféricos, e um mais ~3,5 ml são tirados via o sino periorbital para a extração de soro. A análise gasosa do sangue inclui  
10 análise de pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, aHCO<sub>3</sub> (HCO<sub>3</sub> real), tCO<sub>3</sub>, medições de oximetria de CO (por exemplo, hemoglobina, oxihemoglobina fracionária, oxihemoglobina saturada, carboxihemoglobina e met-hemoglobina).

Todos os animais são adicionalmente testados antes da morte quanto a função pulmonar usando um flexiVent (SCIREQ®), e dados para a  
15 resistência Newtoniana (medição da resistência das vias aéreas centrais) e conformidade são coletados.

Seis animais em cada grupo são mortos, e os pulmões são analisados quanto ao peso úmido, razão de peso para peso do animal, deposição de colágeno (pelo ensaio de hidroxiprolina; ver acima); e  
20 histopatologia (para fibrose, e contagem de inflamação pelo tingimento de H&E). Para os seis animais remanescentes em cada grupo, a lavagem broncoalveolar é realizada, e o fluido de lavagem é analisado quanto as contagens de leucócitos total.

Os dados coletados no estudo, como descrito acima, são  
25 analisados pela análise de variação, comparando o Grupo 1, acima, com os Grupos 2 e 5; comparando o Grupo 2 com os Grupos 4 e 5; comparando o Grupo 3 com os Grupos 4 e 5; e comparação do Grupo 4 com o Grupo 5. O efeito de tratamento global é esperado ser significativo ( $p < 0,05$ ). A administração de células tronco placentárias é esperada fornecer benefício

significante aos animais inoculados com bleomicina que recebem as células (Grupos 4 e 5) comparados com os animais inoculados com a bleomicina que não recebem as células (Grupo 3), com respeito a pelo menos um de função pulmonar, como determinada pelo flexiVent, fibrose (como determinada pelo teste de hidroxiprolina quanto à deposição de colágeno) ou inflamação (como evidenciado pelas células relacionadas com a inflamação reduzida presentes nos fluidos de lavagem brocoalveolar ou imunoistoquímica de tecido pulmonar.

#### 5.4 EXEMPLO 4: ESTUDO PRÉ-CLINICAL DE TRATAMENTO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR USANDO UM MODELO DE ANIMAL

Este Exemplo descreve a conduta de um estudo pré-clínico que demonstra que as células tronco placentárias isoladas, administradas intravenosamente, reduzem a inflamação das vias aéreas.

Grupo alojado de 8 a 12 semana de idade (compatíveis com a idade), camundongos C57BL/6 machos são usados no experimento. Os camundongos são mantidos em um ciclo de Luz:Escuro /12 AM:12 PM em uma instalação com barreira. Alimento e fluidos de beber estão disponíveis ad libitum.

O experimento inclui sete grupos de tratamento, que consiste de 18 camundongos cada. Os camundongos em grupos de 1 a 4 e 6 recebem instilação nas vias aéreas de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), um indutor padrão de inflamação uma vez ao dia em relação ao curso de cinco dias para induzir inflamação das vias aéreas isto é moderada a severa pela examinação histológica. Os camundongos nos grupos 1 e 2 recebem células tronco placentárias isoladas ou células tronco placentárias a 0,5 ou 1,0 milhão de células por animal pela i.v. injeção, por exemplo, na veia de cauda. Os camundongos no grupo 3 são injetados com fibroblastos dérmicos humanos a 1,0 milhão de células por animal por injeção i.v. e serve como um controle celular negativo. Os camundongos do grupo 4 receberam veículo e servem

como um linha de base de grupo de controle negativo. Os camundongos do grupo 5 servem como um grupo de controle de doença, e são instilados com tampão de fosfato salino, mas não recebem qualquer LPS. O tratamento foi realizados 1 hora depois da administração de LPS. Os camundongos do grupo 6 servem como um controle positivo, e recebem um composto de referência, dexametasona, a 10 mg/kg para ser administrada por injeção i.p. 1 hora após a inoculação de LPS. Os camundongos do Grupo 7 recebem apenas uma administração i.v. de 1,0 milhão de células tronco placentárias ou células tronco placentárias, para controlar quanto a administração das células, por exemplo, na infiltração de macrófago nos tecidos pulmonares.

A inflamação pulmonar é induzida pela administração de 2  $\mu$ l de LPS em 30  $\mu$ l de PBS via instilação intra-traqueal uma vez ao dia por cinco dias. O grupo de controle de doença é instilado com um volume igual de solução salina tamponada com fosfato. Cada grupo de tratamento é dividido em três subgrupos de 6 camundongos cada. Os grupos de 6 camundongos passam por lavagem broncoalveolar (BAL) e coleta de tecido em 6, 24 ou 48 horas depois da exposição ao LPS.

As seguintes amostras são coletadas de cada animal em 6, 24 e 48 horas: sangue periférico; fluido de BAL, coletada pela instilação 3 x 1 ml de albumina sérica bovina a 0,1% em solução salina tamponada com fosfato via cânula traqueal; e os pulmões. A composição celular do fluido de lavagem broncoalveolar é determinada pela análise FACS com anticorpos anti-Gr1, anti-CD11b (Mac1) e anti-CD45 usando um FACScan da Becton Dickinson. A composição celular da lavagem é expressa como uma porcentagem de Gr1<sup>+</sup> e CD11b<sup>+</sup> isoladas da população de linfócito ativada. Um dos pulmões é homogeneizado e usado para determinar os níveis de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , mKC (homólogo de camundongo de IL-8), IL-10, MIP-1 $\alpha$  e MIP-2 são determinados no homogenado. O segundo pulmão é fixado em 10% de formalina e processado quanto a análise histopatológica pelo H&E. Os níveis

de  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$ , mKC, IL-10, MIP-1a e MIP-2 também são medidos nos soros dos camundongos pelo ELISA.

O grau de inflamação das vias aéreas é determinado pela análise de infiltração de neutrófilo detectável pela análise de FACS de fluidos de lavagem pulmonar e broncoalveolar, com um aumento nas  $\text{CD45}^+\text{CD11b}^+$  isoladas representando primariamente monócitos/ macrófagos e granulócitos polimórficos, e as  $\text{CD45}^+\text{Gr1}^+$  isoladas são principalmente neutrófilos e granulócitos polimórficos. A administração de células tronco placentárias após a indução de inflamação causa uma redução significativa nas  $\text{CD45}^+\text{CD11b}^+$  isoladas,  $\text{CD45}^+\text{Gr1}^+$  isoladas ou ambas presentes nos fluidos de lavagem pulmonares ou broncoalveolares. A inflamação também é determinada pelos níveis em fluidos BAL de  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$ , mKC, IL-10, MIP-1 $\alpha$  e MIP-2. A administração de células tronco placentárias reduz os níveis de uma ou mais ou todas destas citocinas. O tratamento com dexametasona (composto de referência) a 10 mg/kg diminui o recrutamento de neutrófilo aos pulmões e lavagem depois da administração de LPS.

#### Equivalentes:

As composições e métodos aqui divulgados não devem ser limitados no escopo pelas formas de realização específicas aqui descritas. De fato, várias modificações das composições e métodos além daquelas descritas tornar-se-ão evidentes para aqueles habilitados na técnica a partir da descrição precedente e figuras anexas. Tais modificações são intencionadas a cair dentro do escopo das reivindicações anexas.

Várias publicações, patentes e pedidos de patente são aqui citados, as divulgações dos quais são incorporadas por referência em suas totalidades.

## REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma quantidade terapeuticamente eficaz de células tronco placentárias, caracterizado pelo fato de ser para fabricação de uma composição para o tratamento de um indivíduo tendo uma doença, distúrbio ou condição do pulmão, em que a quantidade terapeuticamente eficaz é uma quantidade suficiente para causar uma melhora detectável em um ou mais sintomas da dita doença, distúrbio ou condição; em que a dita doença, distúrbio ou condição do pulmão é fibrose intersticial pulmonar, sarcoidose pulmonar, asma, bronquite, síndrome da angústia respiratória aguda, ou doença pulmonar obstrutiva crônica; e em que as ditas células tronco placentárias são CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, e CD200<sup>+</sup>, como detectadas pela citometria de fluxo.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende detectar a dita melhora em um ou mais de espirometria, fluxímetro de pico, detecção dos níveis de CO<sub>2</sub> no sangue, radiografia, varredura CT, formação de imagem pela ressonância magnética, broncoscopia ou lavagem broncoalveolar.

3. Uso de uma quantidade terapeuticamente eficaz de células tronco placentárias, caracterizado pelo fato de ser para fabricação de uma composição para o tratamento de um indivíduo tendo uma doença, distúrbio ou condição do pulmão, em que a quantidade terapeuticamente eficaz é uma quantidade suficiente para causar uma melhora detectável em um ou mais sintomas da dita doença, distúrbio ou condição; em que o dito uso compreende detectar a dita melhora por um ou mais dentre espirometria, fluxímetro de pico, detecção dos níveis de CO<sub>2</sub> no sangue, radiografia, varredura CT, formação de imagem pela ressonância magnética, broncoscopia ou lavagem broncoalveolar; e em que as ditas células tronco placentárias são CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, e CD200<sup>+</sup>, como detectadas pela citometria de fluxo.

4. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo

fato de que a dita doença, distúrbio ou condição estão associados com ou causados por uma resposta imune.

5                   5. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a dita doença, distúrbio ou condição estão associados com ou causados por uma doença autoimune.

6. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a dita doença autoimune é a artrite reumatóide, escleroderma, doença do intestino inflamatório ou lupo eritematoso sistêmico.

10                 7. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a dita doença, distúrbio ou condição estão associados com ou causados pela doença do enxerto versus hospedeiro.

8. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a dita doença, distúrbio ou condição é uma doença pulmonar intersticial.

15                 9. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a dita doença pulmonar intersticial é a fibrose intersticial pulmonar ou sarcoidose pulmonar.

20                 10. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a dita doença, distúrbio ou condição é uma doença pulmonar obstrutiva.

11. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a dita doença pulmonar obstrutiva é asma, bronquite, síndrome da angústia respiratória aguda ou doença pulmonar obstrutiva crônica.

25                 12. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a dita doença, distúrbio ou condição é uma lesão pulmonar aguda.

13. Uso de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a dita lesão pulmonar aguda é causada por uma queimadura química, inalação de fumaça ou exposição a uma substância tóxica.

14. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo

---

fato de que a dita doença, distúrbio ou condição é uma lesão pulmonar causada por uma doença neoplástica ou paraneoplástica, pneumonia ou fibrose cística.

15. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o dito tratamento resulta em um volume expiratório forçado em 1 segundo (FEV<sub>1</sub>) para a razão de capacidade vital forçada (FVC) acima de 0,7.

16. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 3, caracterizado pelo fato de que as ditas células são adicionalmente CD90<sup>+</sup> e CD45<sup>-</sup>, como detectadas pela citometria de fluxo.

17. Uso de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que as ditas células são adicionalmente CD44<sup>+</sup>, como detectadas pela citometria de fluxo.

18. Uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que as ditas células são adicionalmente CD80<sup>-</sup> e CD86<sup>-</sup>, como detectadas pela citometria de fluxo.

19. Uso de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que as ditas células são uma ou mais de CD29<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, SH3<sup>+</sup> ou SH4<sup>+</sup>, como detectadas pela citometria de fluxo.

20. Uso de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que as ditas células são adicionalmente pelo menos uma de CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD117<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, KDR<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, HLA-ABC<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>-</sup> ou PDL<sup>+</sup>.

RESUMO

“USO DE UMA QUANTIDADE TERAPEUTICAMENTE EFICAZ DE  
CÉLULAS TRONCO PLACENTÁRIAS”

São aqui fornecidas composições e métodos de tratamento de  
5 indivíduos tendo uma doença, distúrbio ou condição do pulmão, que  
compreende administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de células  
placentárias, por exemplo, células tronco placentárias.