

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

(22) Data de pedido: 2007.01.23	(73) Titular(es): ATHERSYS, INC. 3201 CARNEGIE AVENUE CLEVELAND OH 44115 US
(30) Prioridade(s): 2006.01.23 US 760951 P	MEDICAL COLLEGE OF GEORGIA RESEARCH INSTITUTE, INC US
(43) Data de publicação do pedido: 2008.10.22	(72) Inventor(es): ROBERT W. MAYS US ROBERT J. DEANS US DAVID C. HESS US JAMES E. CARROLL US CESAR V. BORLONGAN US
(45) Data e BPI da concessão: 2013.04.24 127/2013	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **TRATAMENTO COM MAPC DE LESÕES E DOENÇAS CEREBRAIS**

(57) Resumo:

INVENÇÃO REFERE-SE AO TRATAMENTO DE VÁRIAS LESÕES, DISTÚRBIOS, DISFUNÇÕES, DOENÇAS E SEMELHANTES DO CÉREBRO COM MAPCS, PARTICULARMENTE EM ALGUNS ASPETOS, AO TRATAMENTO DOS MESMOS RESULTANTES DE HIPÓXIA, INCLUINDO AQUELES CAUSADOS POR HIPÓXIA SISTÉMICA E AQUELES CAUSADOS POR INSUFICIENTE FORNECIMENTO SANGUÍNEO. EM ALGUMAS OUTRAS ESPECIFICAÇÕES A INVENÇÃO REFERE-SE, POR EXEMPLO, AO TRATAMENTO DA LESÃO CEREBRAL HIPÓXICA-ISQUÉMICA COM MAPCS, EM CRIANÇAS POR EXEMPLO, E AO TRATAMENTO DE ENFARTES CORTICAIS E ACIDENTES VASCULARES CEREBRAIS COM MAPCS EM ADULTOS, POR EXEMPLO.

RESUMO**"TRATAMENTO COM MAPC DE LESÕES E DOENÇAS CEREBRAIS"**

A invenção refere-se ao tratamento de várias lesões, distúrbios, disfunções, doenças e semelhantes do cérebro com MAPCs, particularmente em alguns aspetos, ao tratamento dos mesmos resultantes de hipóxia, incluindo aqueles causados por hipóxia sistémica e aqueles causados por insuficiente fornecimento sanguíneo. Em algumas outras especificações a invenção refere-se, por exemplo, ao tratamento da lesão cerebral hipóxica-isquémica com MAPCs, em crianças por exemplo, e ao tratamento de enfartes corticais e acidentes vasculares cerebrais com MAPCs em adultos, por exemplo.

DESCRIÇÃO

"TRATAMENTO COM MAPC DE LESÕES E DOENÇAS CEREBRAIS"

Descrição

Domínio da Invenção

O domínio da invenção é o tratamento de lesão, distúrbio, disfunção e doença cerebral utilizando células progenitoras adultas multipotentes ("MAPCs"), em particular o tratamento de lesões cerebrais hipóxicas e isquêmicas, incluindo lesão cerebral hipóxica-isquêmica e acidente vascular cerebral.

Antecedentes da Invenção

As lesões cerebrais, incluindo doenças cerebrais, são um grave problema de saúde nos EUA e a nível mundial. Muitas lesões cerebrais têm origem na hipóxia, incluindo hipóxias focais, frequentemente causadas por estenose ou bloqueio do fornecimento sanguíneo ao cérebro, e hipóxias difusas, geralmente causadas por constrições do fornecimento de ar de um sujeito. As hipóxias focais podem levar a, por exemplo, enfartes corticais e acidentes vasculares cerebrais. As hipóxias difusas podem levar a lesão cerebral hipóxica-isquêmica ("lesão HI"). Os enfartes corticais e acidentes vasculares cerebrais, assim como lesão HI, são problemas de saúde significantes.

A lesão HI e as suas complicações relacionadas afetam um número significativo de nados vivos todos os anos. Determinar a incidência e efeitos da lesão cerebral isquêmica e hipóxica em crianças é complexo; mas o número de doentes afetados é grande em qualquer avaliação. As

lesões HI têm uma incidência tão grande quanto 1 em 4000 nados vivos. Ver Nelson *et al.*, Lancet Neurol. 3:150-158 (2004). A maioria destas crianças sobrevive com consideráveis défices cognitivos e motores. Ver Barker, Ann Med. 31: Supl 1:3-6 (1999). A encefalopatia neonatal devido a todas as causas ocorre em 1 a 6 em cada 1000 nascimentos. Ver, por exemplo, o sítio web do "American College of Obstetricians and Gynecologists": www.acog.org. O risco de asfixia neonatal intraparto é estimado em 2,5% de todos os nados vivos. Ver Heinonen *et al.*, BJOG 109: 261-264 (2002). Fora deste grande número de crianças, um número menor sofre encefalopatia HI suficiente para provocar lesão cerebral com incapacidade motora e cognitiva associada. A paralisia cerebral, ou incapacidade motora crónica, não-progressiva, afeta 1 a 2 em cada 1000 indivíduos nos Estados Unidos da América. Cerca de 6% destes doentes adquiriram a sua incapacidade devido a lesões durante o nascimento relacionadas com lesão HI. Ver, por exemplo, o sítio web NINDS em www.ninds.nih.gov.

O atual resultado clínico global de bebés de termo com lesão HI é pobre. De todos os neonatos de termo que sofrem uma lesão HI, 10% morrem e 30% ficam com incapacidade neurológica permanente. Ver Volpe, *"Neurology of the Newborn"*, 4^a ed., W.B. Saunders, Philadelphia (2001). A estatística gerada do grupo de controlo do ensaio clínico em hipotermia, fase I, recentemente publicado "Randomized Controlled Trial of Hypothermia for Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in Term Infants", verificou até níveis mais elevados de mortalidade: 37% dos neonatos incluídos morreram e 25% tinham incapacidade neurológica. Ver Shankaran *et al.*, NEngl J Med. 353: 1574-1584 (2005).

Além de cuidados de suporte, a terapia para lesão HI é limitada. Foi reportado que a hipotermia corporal total é

segura e benéfica num ensaio clínico de fase I, multicêntrico, no tratamento de HI neonatal. No entanto, a utilidade da terapia parece estar limitada ao período logo a seguir ao nascimento. Ver Shankaran (2005) citado anteriormente.

A falta de terapia, número de indivíduos afetados, associado aos custos necessários para providenciar cuidados e reabilitação para toda a vida, mostra que a lesão HI representa uma necessidade médica atual, significativa, não satisfeita. O mesmo se aplica a uma variedade de outras condições caracterizadas por lesão do tecido cerebral, particularmente tecido cerebral cortical, tal como resultante de hipóxia, enfarte, e outras lesões e/ou agressões, tal como, por exemplo lesões que produzem isquémia e/ou necrose, tal como isquémia e/ou necrose resultando em e/ou associada a lesão cerebral HI, acidente cerebral, e/ou acidente vascular cerebral. Existe por isso uma necessidade para métodos melhorados para o tratamento destes e lesões, patologias e doenças relacionadas e similares.

A utilização de células estaminais atraiu algum interesse para este fim, e verificaram-se algumas observações encorajantes nesta área. Foi isolada e caracterizada uma variedade de células estaminais nos últimos anos. Elas vão desde aquelas com potencial de diferenciação altamente restrito e capacidade limitada de crescer em cultura até aquelas com potencial de diferenciação aparentemente sem restrições e capacidade ilimitada de crescer em cultura. As primeiras têm sido geralmente as mais fáceis de derivar e podem ser obtidas de uma variedade de tecidos adultos. As últimas têm de ser derivadas de células germinativas e embriões, e são chamadas de células estaminais embrionárias ("ES"), células germinativas embrionárias ("EG"), e células

germinativas. As células estaminais embrionárias ("ES") têm auto-renovação ilimitada e podem diferenciar-se em todos os tipos de tecidos. As células ES são derivadas da massa celular interna do blastocisto. As células germinativas embrionárias ("EG") são derivadas de células germinativas primordiais de um embrião pós-implante. As células estaminais derivadas de tecido adulto têm tido um valor limitado porque são imunogênicas, têm potencial de diferenciação limitado, e têm capacidade limitada de se propagarem em cultura. ES, EG, e células germinativas não têm estas desvantagens, mas têm uma propensão marcada para formar teratomas em hospedeiros alogênicos, suscitando preocupações pertinentes relativamente à sua utilização em tratamentos médicos. Por esta razão, existe pessimismo sobre a sua utilidade em aplicações clínicas apesar do seu vantajosamente extenso potencial de diferenciação. As células estaminais derivadas de embriões também estão sujeitas a controvérsia ética que podem impedir a sua utilização no tratamento de doenças.

Alguns esforços para encontrar uma alternativa a ES, EG, e células germinativas focaram-se em células derivadas de tecido adulto. Embora tenham sido identificadas células estaminais adultas na maioria dos tecidos de mamíferos, o seu potencial de diferenciação é restrito e consideravelmente mais limitado do que aquele de ES, EG, e células germinativas. De fato muitas destas células podem dar origem a apenas um ou poucos tipos de células diferenciadas, e muitas outras estão restritas a uma única linhagem embrionária. Por exemplo, as células estaminais hematopoiéticas podem diferenciar-se apenas para formar células da linhagem hematopoiética, células estaminais neuronais diferenciam-se em células apenas de origem neuroectodérmica, e células estaminais mesenquimais ("MSCs") estão limitadas a células de origem mesenquimal

(tipos de células mesodérmicas). Por conseguinte, estes tipos de células estaminais são, inerentemente, limitados na sua aplicabilidade terapêutica.

Por conseguinte, tem havido uma necessidade de células estaminais que possam ser utilizadas no tratamento de enfartes corticais, lesão HI, e outras doenças, que tenham a capacidade de auto-renovação e de diferenciação de ES, EG, e células germinativas, mas não sejam imunogénicas; não formem teratomas quando se faz um aloenxerto ou um xenoenxerto num hospedeiro; não coloquem outras questões de segurança associadas com ES, EG, e células germinativas; mantenham as outras vantagens de ES, EG, e células germinativas; sejam fáceis de isolar de fontes facilmente disponíveis, tal como placenta, cordão umbilical, sangue do cordão umbilical, sangue, e medula óssea; possam ser armazenadas seguramente por períodos extensos; possam ser obtidas facilmente e sem risco para os voluntários, doadores ou doentes, e outros que tenham dado o consentimento; e não acarretem as dificuldades técnicas e logísticas envolvidas na obtenção e no trabalho com ES, EG, e células germinativas.

Um tipo de célula, chamada aqui células progenitoras adultas multipotentes ("MAPCs"), foi isolada e caracterizada (ver, por exemplo, patente US nº. 7,015,037). ("MAPCs" também têm sido referidas como "MASCs.") Estas células proporcionam muitas das vantagens de ES, EG, e células germinativas sem muitos dos seus inconvenientes. Por exemplo, MAPCs são capazes de cultura ilimitada sem perda do seu potencial de diferenciação. Elas apresentam enxertagem eficiente, a longo prazo e diferenciação em múltiplas linhagens de desenvolvimento em ratinhos NOD-SCID e isto sem evidência de formação de teratoma (frequentemente visto com ES, EG, e células germinativas)

(Reyes, M. e C.M. Verfaillie Ann NY Acad Sci. 938: 231-5 (2001)).

Sumário da Invenção

Nalgumas das suas formas de realização, por isso, a invenção põe à disposição células para utilização no tratamento de lesão cerebral num sujeito que tenha a probabilidade de sofrer, que sofra ou que tenha sofrido uma lesão cerebral, em que as células (i) não são células estaminais embrionárias, não são células germinativas embrionárias, e não são células germinativas; (ii) podem diferenciar-se em pelo menos um tipo de células de cada de pelo menos duas das linhagens embrionárias endodérmica, ectodérmica, e mesodérmica; e são administradas por uma via efetiva e numa quantidade efetiva para tratar a dita lesão cerebral, com ou sem tratamento imunossupressora adjuvante.

Em formas de realização a lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença é uma lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença do cérebro. Em formas de realização é uma lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença no e/ou do córtex cerebral. Em formas de realização é uma lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença no e/ou do hipocampo. Em formas de realização é uma lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença no e/ou do córtex do cérebro (também referido como a região cortical do cérebro).

Em formas de realização relativamente a todo e cada um do supracitado, entre outros, a lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença é uma lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença associada com e/ou causada por falta de oxigénio. Em formas de realização neste sentido a lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença é causada por hipóxia. Em formas de realização neste sentido a hipóxia é focal. Em formas de realização

neste sentido a hipóxia é difusa. Em formas de realização neste sentido a doença é lesão cerebral hipóxica-isquêmica.

Em formas de realização além disso a respeito ao mesmo, a lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença é uma lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença associada com e/ou causada por insuficiente fornecimento de sangue. Em formas de realização neste sentido a lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença é causada por uma estenose ou bloqueio arterial ou venoso, incluindo mas não limitado a um bloqueio causado por um trombo ou um êmbolo. Em formas de realização neste sentido a lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença está associada com e/ou causada por um enfarte e/ou isquemia. Em formas de realização neste sentido a lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença está associada com e/ou causada por necrose. Em formas de realização neste sentido o enfarte é um enfarte cortical. Em formas de realização neste sentido a lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença é um acidente vascular cerebral.

Em formas de realização da invenção as células (MAPCs) são utilizadas isoladamente. Em formas de realização as células são utilizadas juntamente com outros agentes terapêuticos como modalidade terapêutica primária. Em formas de realização as células são utilizadas como único agente terapêutico. Em algumas formas de realização as células são utilizadas juntamente com um ou mais outros agentes terapêuticos. Em algumas formas de realização as células são utilizadas isoladamente ou com um ou mais outros agentes terapêuticos numa ou mais modalidades terapêuticas primárias. Em algumas formas de realização as células são utilizadas isoladamente ou com um ou mais outros agentes terapêuticos numa ou mais modalidades terapêuticas adjuvantes. Em algumas formas de realização as células são utilizadas isoladamente ou com uma ou mais outros agentes

terapêuticos em uma ou mais modalidades terapêuticas primárias e em uma ou mais adjuvantes.

Matéria da invenção em alguns aspetos e formas de realização é adicionalmente estipulado ilustrativamente nos seguintes parágrafos numerados. Os parágrafos são ilustrativos da invenção, e uma completa compreensão da invenção pode ser apenas obtida lendo a presente divulgação na sua totalidade, incluindo todo o texto, todas as figuras, o resumo incluso posto à disposição e interpretando a matéria aqui descrita ilustrativamente do ponto de vista e com o conhecimento e experiência de um perito na especialidade pertinente à mesma e ao qual pertence a invenção.

A frase "de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue" especificado em qualquer parágrafo numerado significa a matéria desse parágrafo individualmente em cada possível combinação com a matéria de qualquer um ou mais outros parágrafos numerados. Neste sentido, os parágrafos corroboram explicitamente reivindicações de todas tais combinações da matéria especificadas aqui. Em certas instâncias, onde a matéria de um parágrafo numerado é excluído de combinação com a matéria de um parágrafo numerado diferente, a exclusão é indicada pela frase "de acordo com o supracitado ou do que se segue exceto número(s)" em que o(s) número(s) identifica(m) o(s) parágrafo(s) excluído(s).

1. Células para utilização no tratamento de uma lesão cerebral e/ou disfunção cerebral, e/ou distúrbio cerebral e/ou doença cerebral num sujeito, compreendendo: administração a um sujeito provável de sofrer, a sofrer, ou que tenha sofrido uma lesão cerebral e/ou disfunção cerebral, e/ou distúrbio cerebral e/ou doença cerebral

através de uma via efetiva e numa quantidade efetiva para tratar a dita lesão cerebral e/ou disfunção cerebral, e/ou distúrbio cerebral e/ou doença cerebral, células (MAPCs) que: não são células estaminais embrionárias, células germinativas embrionárias, ou células germinativas, e podem diferenciar-se em pelo menos um tipo de células de cada de pelo menos duas das linhagens embrionárias endodérmica, ectodérmica, e mesodérmica.

2. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, exceto 60-65, em que o dito sujeito não é tratado com uma terapia imunossupressora adjuvante ao tratamento com as ditas células.

3. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, em que a lesão cerebral e/ou disfunção cerebral, e/ou distúrbio cerebral e/ou doença cerebral é causada por hipóxia.

4. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, em que a lesão cerebral e/ou disfunção cerebral, e/ou distúrbio cerebral e/ou doença cerebral é causada por uma oclusão ou um bloqueio do fornecimento sanguíneo ao cérebro.

5. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, em que a lesão cerebral e/ou disfunção cerebral, e/ou distúrbio cerebral e/ou doença cerebral é um enfarte.

6. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, em que a lesão cerebral e/ou disfunção cerebral, e/ou distúrbio cerebral e/ou doença cerebral é um enfarte cortical.

7. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, em que a lesão cerebral e/ou disfunção cerebral, e/ou distúrbio cerebral e/ou doença cerebral é um acidente vascular cerebral.

8. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, em que a lesão cerebral e/ou disfunção cerebral, e/ou distúrbio cerebral e/ou doença cerebral é uma lesão cerebral hipóxica-isquêmica.

As células não podem ser imunogénicas nos ditos sujeitos.

9. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, em que as ditas células se podem diferenciar em pelo menos um tipo celular de cada uma das linhagens embrionárias endodérmica, ectodérmica, e mesodérmica.

10. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, em que as ditas células expressam telomerase.

11. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, em que as ditas células são positivas para oct-3/4.

12. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, em que as ditas células realizaram pelo menos 10 a 40 divisões celulares em cultura antes da sua administração ao sujeito.

As células podem ser células de mamíferos incluindo células humanas, de cavalo, de vaca, de cabra, de ovelha, de porco, de rato, ou ratinho.

As células podem ser derivadas de células isoladas de qualquer tecido placentário, tecido do cordão umbilical,

sangue do cordão umbilical, medula óssea, sangue, tecido do baço, tecido do timo, tecido da espinal medula, tecido adiposo, e tecido hepático.

13. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, em que as ditas células são derivadas de células isoladas de qualquer um ou mais de medula óssea ou sangue.

14. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, em que as ditas células são alogénicas para o sujeito.

15. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, em que as ditas células são xenogénicas para o sujeito.

O sujeito pode ser um mamífero.

O sujeito pode ser um animal de estimação mamífero, um animal de gado mamífero, um animal de investigação mamífero ou um primata não humano.

O sujeito pode ser um humano.

16. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, em que as ditas células são administradas ao sujeito numa ou mais doses compreendendo 10^5 a 10^8 das ditas células por quilograma da massa do sujeito.

As células podem ser administradas ao sujeito numa ou mais doses compreendendo 10^4 a 10^8 incluindo 10^5 a 10^7 das ditas células por quilograma da massa do sujeito.

17. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, em que as ditas células são administradas ao

sujeito numa ou mais doses compreendendo 10^6 a 5×10^7 das ditas células por quilograma da massa do sujeito.

As células podem ser administradas ao sujeito em uma ou mais doses compreendendo 2×10^7 a 4×10^7 das ditas células por quilograma da massa do sujeito.

Além das ditas células, pode ser administrado um ou mais fatores ao dito sujeito.

Além das ditas células, pode ser administrado ao dito sujeito um ou mais fatores de crescimento, fatores de diferenciação, fatores de sinalização, e/ou fatores que aumentam o "*homing*".

Pode ser administrado ao dito sujeito uma ou mais citoquinas.

As células podem ser administradas ao sujeito adjuvantemente com outro tratamento que é administrado antes, ao mesmo tempo ou após as ditas células serem administradas.

18. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, em que além disso é administrado ao sujeito um ou mais agentes antibióticos.

19. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, em que além disso é administrado ao sujeito um ou mais agentes antifúngicos.

20. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, em que além disso é administrado ao sujeito um ou mais agentes antivirais.

Pode se administrado ao dito sujeito qualquer combinação de dois ou mais agentes antibióticos e/ou agentes antifúngicos e/ou agentes antivirais.

As células podem ser administradas numa formulação compreendendo um mais outros princípios ativos farmacêuticos.

As células podem ser administradas numa formulação compreendendo um ou mais agentes antibióticos.

As células podem ser administradas numa formulação compreendendo um ou mais agentes antifúngicos.

As células podem ser administradas numa formulação compreendendo um ou mais agentes antivirais.

21. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, em que as ditas células são administradas ao sujeito por uma via parentérica.

As células podem ser administradas ao sujeito por qualquer uma ou mais das seguintes vias parentéricas: injeção intravenosa, intra-arterial, intracardiaca, intra-espinhal, intratecal, intra-óssea, intra-articular, intra-sinovial, intra-cutânea, intradérmica, subcutânea, e intramuscular.

As células podem ser administradas ao sujeito através de uma agulha hipodérmica com uma seringa ou podem ser administradas ao sujeito através de um catéter.

As células podem ser administradas por implantação cirúrgica.

As células podem ser administradas ao sujeito através de implantação utilizando um procedimento artroscópico.

22. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, em que as ditas células são administradas ao sujeito por injeção estereotáxica.

As células podem ser administradas ao sujeito num ou sobre um suporte.

As células podem ser administradas ao sujeito numa forma encapsulada.

As células podem ser apropriadamente formuladas para administração por qualquer uma ou mais das seguintes vias: oral, retal, epicutânea, ocular, nasal, e pulmonar.

As células podem ser administradas ao sujeito em uma dose.

As células podem ser administradas ao sujeito numa série de duas ou mais doses em sucessão.

As células podem ser administradas numa única dose, em duas doses, ou em mais de duas doses, em que as doses são as mesmas ou diferentes, e elas são administradas em intervalos iguais ou desiguais entre elas.

As células podem ser administradas por um período de menos de um dia até uma semana, uma semana até um mês, um mês até um ano, um ano até dois anos, ou por mais tempo que dois anos.

23. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, exceto 2, em que adicionalmente ao tratamento com

as ditas células, o sujeito foi, irá ser, ou está a ser tratado com um ou mais agentes imunossupressores.

24. Células de acordo com qualquer do supracitado ou do que se segue, exceto 2, em que adicionalmente ao tratamento com as ditas células, o sujeito foi, irá ser, ou está a ser tratado com um ou mais de um corticosteroide, ciclosporina A, agente imunossupressor semelhante à ciclosporina, ciclofosfamida, globulina antitimócito, azatioprina, rapamicina, FK-506, e um agente imunossupressor semelhante a um macrólido que não o FK-506, e um agente anticorpo monoclonal imunossupressor (i.e., um imunossupressor que é um anticorpo monoclonal imunossupressor ou é um agente compreendendo um anticorpo monoclonal, inteiro ou em uma ou mais partes, tal como uma proteína quimérica compreendendo um local de ligação Fc ou Ag de um anticorpo monoclonal).

As células podem ser administradas numa formulação compreendendo um ou mais agentes imunossupressores.

As células podem ser administradas numa formulação compreendendo um ou mais corticosteroide, ciclosporina A, agente imunossupressor semelhante à ciclosporina, ciclofosfamida, globulina antitimócito, azatioprina, rapamicina, FK-506, e um agente imunossupressor semelhante a um macrólido que não o FK-506, e um agente anticorpo monoclonal imunossupressor.

As células podem ser administradas numa formulação compreendendo um ou mais corticosteroide, ciclosporina A, azatioprina, ciclofosfamida, rapamicina, FK-506, e um agente anticorpo monoclonal imunossupressor.

Breve Descrições das Figuras

A figura 1 é um fluxograma que mostra os protocolos experimentais gerais utilizados em certos exemplos aqui descritos, como enunciado no Exemplo 1.

A figura 2 é uma série de gráficos que mostram que transplantes de MAPC singénico e alogénico promovem recuperação comportamental em ratos HI neonatais, como descrito no Exemplo 2. Os testes comportamentais relativamente às funções motoras e neurológicas foram realizadas nos dias 7 e 14 em animais que receberam transplantes MAPC singénico e alogénico. Os animais inicialmente exibiram uma tendência para menos défices comportamentais no 7º dia após transplantação, e depois apresentaram anomalias motoras significativamente reduzidas no 14º dia após transplantação em comparação com os controlos. Os asteriscos indicam significância estatística $p < 0,05$ versus os controlos negativos (infusão de veículo).

A figura 3 é um gráfico que mostra que os enxertos de MAPC reduzem perda celular neuronal CA3 em animais com lesão HI, como descrito no Exemplo 3. O gráfico mostra células viáveis observadas através de análise histológica de seções do hipocampo. Os animais foram sacrificados no dia 14 após transplantação de MAPCs. Foram preparadas seções do cérebro, coradas com Nissl, e examinadas relativamente à viabilidade neuronal nos hipocampos de animais tratados com MAPC e veículo. Foram contadas as células viáveis por campo em ambos os campos do hipocampo lesionado e não lesionado contralateral em cada seção, e estas contagens foram comparadas. As contagens de células do hipocampo não lesionado foram igualadas a 100%. Os dados demonstram proteção estatisticamente significativa dos neurónios na região CA3 após a transplantação de MAPC (valor ANOVA F é 35,33, $df = 2, 19$ e $p < 0,0001$; post-hoc de Fisher é $p < 0,0001$).

A figura 4 é uma série de gráficos que mostra que transplantes xenogénicos de MAPC promovem a recuperação comportamental em ratos adultos em seguimento de um acidente vascular cerebral isquémico cirurgicamente induzido, como descrito no Exemplo 7. Foram conduzidos testes comportamentais relativamente às funções motoras e neurológicas nos dias 14 e 21 após a indução de acidente vascular cerebral (dias 7 e 14 pós transplantação intracranial). Os animais receberam 100.000, 200.000 e 400.000 células xenogénicos MAPC ou PBS como veículo apenas para controlo. Os asteriscos indicam a diferença significativa entre o grupo controlo e o grupo experimental com MAPC (determinações repetidas de ANOVA, $p < 0,0001$; t-teste post-hoc de Fisher PLSD, $p' s < 0,0001$).

A figura 5 é um gráfico que mostra que transplantes xenogénicos e alogénicos de MAPC promovem recuperação locomotora sustentada e estatisticamente significativa em seguimento de um acidente vascular cerebral isquémico, em ratos. Foram conduzidos testes comportamentais relativamente às funções locomotoras no dia 14, e cada 14º dia depois disso durante 56 dias, como descrito no Exemplo 10. Os asteriscos indicam significância estatística a $p < 0,0001$ versus controlos negativos (MAPCs irradiadas não viáveis).

A figura 6 é um gráfico que mostra que os transplantes xenogénicos e alogénicos de MAPC promovem recuperação neurológica sustentada e estatisticamente significativa em seguimento de acidente vascular cerebral isquémico em ratos. Foram conduzidos testes comportamentais relativamente às funções neurológicas no dia 14 e a cada 14º dia depois disso durante 56 dias, como descrito no Exemplo 10. Os asteriscos indicam significância estatística

a $p < 0,0001$ versus controlos negativos (MAPCs irradiadas não viáveis).

A figura 7 é um gráfico que mostra uma melhoria da função locomotora dependente da dose aquando da administração de MAPCs xenogénicas a ratos com acidente vascular cerebral isquémico, como descrito no Exemplo 12. Foram conduzidos testes comportamentais relativamente às funções locomotoras no dia 14 e a cada 14º dia depois disso durante 56 dias. Os asteriscos indicam significância estatística a $p < 0,01$ versus controlos negativos (MAPCs irradiadas não viáveis).

A figura 8 é um gráfico que mostra melhoria das funções neurológicas dependente da dose em ratos com acidente vascular cerebral isquémico tratados com MAPCs xenogénicas, como descrito no Exemplo 12. Foram conduzidos testes Bederson relativamente às funções neurológicas no dia 14 e a cada 14º dia depois disso durante 56 dias. Os asteriscos indicam significância estatística $p < 0,01$ versus controlos negativos (MAPCs irradiadas não viáveis).

A figura 9 é um gráfico que mostra melhorias das funções locomotoras dependente da dose em ratos com acidente vascular cerebral isquémico tratados com MAPCs xenogénicas, como descrito no Exemplo 14. Foi conduzido EBST para determinar a função locomotora uma semana após a infusão IV e depois uma vez por semana cada semana até à semana 8 para demonstrar a eficácia a longo prazo. Atraso 1 indica o grupo que recebeu células um dia após a indução da lesão isquémica, Atraso 2 é o grupo que recebeu células dois dias após a lesão, e Atraso 7 o grupo que recebeu células sete dias após a lesão isquémica. Os asteriscos indicam significância estatística a $p < 0,001$ versus controlos negativos (MAPCs irradiadas não viáveis administradas no 7º dia após o acidente vascular cerebral).

A figura 10 é um gráfico que mostra melhorias da função neurológica dependente da dose em ratos com acidente vascular cerebral isquémico tratados como MAPCs xenogénicas, como descrito no Exemplo 14. Foram conduzidos testes Bederson para determinar a função neurológica uma semana após a infusão IV e depois uma vez por semana cada semana até à semana 8 para demonstrar a eficácia a longo prazo. Atraso 1 indica o grupo que recebeu células um dia após a indução da lesão isquémica, Atraso 2 é o grupo que recebeu células dois dias após a lesão isquémica. Atraso 7 indica o grupo que recebeu células sete dias após a lesão isquémica. Os asteriscos indicam significância estatística $p < 0,001$ versus controlos negativos (MAPCs irradiadas não viáveis administradas no dia 7 após o acidente vascular cerebral).

A figura 11 é um gráfico e fotos que mostram que a perda celular neuronal endógena em ratos com acidente vascular cerebral isquémico é reduzida ao longo do tempo através de infusão IV de MAPCs, como descrito no Exemplo 16. Os animais foram sacrificados no dia 56 após o início da infusão de MAPCs. Foram preparadas seções do cérebro e coradas com Nissl para determinar a viabilidade neuronal. A viabilidade foi determinada em todos os animais enxertados e a viabilidade neuronal foi comparada em animais que receberam MAPCs em diferentes momentos após a lesão. Foram contadas as células viáveis por campo para cada local de lesão e para um local não lesionado no campo contralateral na mesma seção, e os resultados foram comparados. A contagem do lado contralateral não lesionado foi igualada a 100%. Os dados, mostrados no gráfico na figura 11, mostram proteção estatisticamente significativa dos neurónios na zona de penumbra após a transplantação de MAPC. Os asteriscos indicam significância estatística de $p < 0.05$

versus outros grupos. Inserções em cima do gráfico mostram cortes transversais representativos dos locais lesionados.

Glossário

De um modo geral, os termos e frases são utilizados aqui de acordo com os seus significados definidos pela especialidade. Para evitar possíveis ambiguidades, no entanto, os significados de certos termos e frases utilizados aqui são descritos de seguida.

"Um" ou "uma" significa um ou mais; pelo menos um.

"Adjuvante" significa em conjunto, juntamente com, adicionalmente a, em conjunção com, e semelhantes.

"Enfarte cerebral," "infarte cerebral" refere-se a uma condição isquémica do cérebro causada por uma obstrução no fluxo sanguíneo para ou através do cérebro. Os enfartes do cérebro levam tipicamente à necrose do tecido que foi privado de oxigénio por falta de fluxo sanguíneo devido à obstrução. Os enfartes cerebrais frequentemente resultam em défices neurológicos focais persistentes.

"Acidentes cerebrovasculares" significa o mesmo que acidente vascular cerebral.

"Isquémia cerebral" refere-se à condição que ocorre quando o fluxo sanguíneo para o cérebro diminui abaixo do mínimo necessário para manter a função neurológica normal. A isquémia cerebral é frequentemente causada por estenose da artéria carótida, estenose da artéria basilar, estenose da artéria vertebral, e doença cerebral oclusiva. Também pode ser causada pela doença de Moyamoya e arterite de Takayasu.

"Co-administrar" pode incluir a administração simultânea ou sequencial de dois ou mais agentes.

"Cortical" refere-se à porção exterior de um órgão ou de uma parte de um órgão ou semelhante. Por exemplo a porção externa do cérebro é referida como córtex cerebral. O córtex cerebral humano tem 2-4 mm (0,08-0,16 polegadas) de espessura e tem um papel central em muitas funções complexas do cérebro. A superfície do córtex cerebral humano é pregueada, e mais de dois terços da superfície cortical encontra-se nos vales das pregas, chamados "sulcos". A parte mais antiga filogeneticamente do córtex cerebral é chamada de hipocampo. A porção evoluída mais recentemente é chamada de neo-córtex.

"Enfarte cortical" refere-se a um enfarte associado à perda de fornecimento de sangue ao córtex do cérebro; tipicamente um enfarte associado à perda de fornecimento sanguíneo ao cérebro: enfarte cortical tem o significado análogo ao de enfarte cerebral.

"Citoquinas" refere-se a fatores celulares que induzem ou aumentam o movimento celular, tal como "*homing*" de MAPCs ou outras células estaminais, células progenitoras, ou células diferenciadas. As citoquinas podem também estimular a divisão de tais células.

"Deletério" significa, como é utilizado aqui, nocivo. A título de exemplo, "resposta imunitária deletéria" significa, como é utilizado aqui, uma resposta imunitária nociva, tal como aquelas em que existe falência destas ou são fracas demais, aquelas que são fortes demais, e/ou aquelas que são mal direcionadas. Também entre as respostas imunitárias deletérias estão as repostas imunitárias que interferem com tratamento médico, incluindo respostas

imunitárias de outra forma normais. Exemplos incluem respostas envolvidas na rejeição de transplantes e enxertos, e a resposta de células imunocompetentes em transplantes e enxertos que causam doença do enxerto contra hospedeiro.

"Fatores de diferenciação" refere-se a fatores celulares, tais como fatores de crescimento, que induzem comprometimento para uma linhagem.

"Disfunção" significa, como utilizado aqui, um distúrbio, doença, ou efeito deletério de um processo de outra forma normal. A título de exemplo, os enfartes corticais e a falta de oxigénio (hipóxia) podem causar disfunções tais como ou que levam a lesão isquêmica. Outras disfunções também incluem, por exemplo, respostas imunitárias envolvidas na rejeição de transplantes e enxertos, e a resposta de células imunocompetentes em transplantes e enxertos que causam doença do enxerto contra hospedeiro, que geralmente depois tem de ser tratado com regimes imunossupressores.

"Células EC" refere-se a células do carcinoma embrionário.

"Quantidade efetiva" "dose efetiva" e semelhante geralmente significa uma quantidade que provoca o efeito local ou sistémico desejado. Por exemplo, uma quantidade efetiva é uma quantidade suficiente para produzir um resultado benéfico ou clínico desejado. A quantidade efetiva pode ser dada toda de uma vez numa única administração ou em quantidades fracionadas que abrangem a quantidade efetiva em várias administrações. Por exemplo, uma quantidade efetiva de MAPCs pode ser administrada numa ou em várias administrações e pode incluir qualquer quantidade pré-selecionada de células. A determinação precisa do que deve

ser considerado como quantidade efetiva pode ser baseado em fatores individuais para cada sujeito, incluindo o seu tamanho, idade, lesão, e/ou doença ou lesão a ser tratada, e a quantidade de tempo que decorreu desde que ocorreu a lesão ou que a doença teve início. Um perito na especialidade irá ser capaz de determinar a quantidade efetiva para um determinado sujeito baseado nestas considerações que são rotina na especialidade. Assim, por exemplo, o perito na especialidade, tal como um médico, baseado nas propriedades conhecidas de MAPCs como divulgado aqui e na especialidade, juntamente com a consideração dos fatores precedentes, irá ser capaz de determinar a quantidade efetiva de MAPCs para um determinado sujeito. Como utilizado aqui, "dose efetiva" significa o mesmo que uma "quantidade efetiva."

Em geral o termo efetivo neste contexto significa suficiente para alcançar o resultado desejável, que pode ser um melhor prognóstico e/ou um melhor estado do doente em certos aspetos. Frequentemente refere-se à melhoria ou cura de uma lesão, disfunção, distúrbio, ou doença. No caso de lesão, disfunção, distúrbio, ou doença cerebral, por exemplo, uma dose efetiva pode ser aquela que alcança um resultado neurológico desejável, o qual pode incluir diminuição da lesão celular em relação ao que iria ocorrer na ausência de tratamento com a quantidade "efetiva", impedimento total de lesão celular adicional e/ou reversão da lesão celular. "Efetivo" neste contexto também pode ser definido como um resultado clínico de tal forma que não haja mais declínio da função neurológica e/ou melhoria da função neurológica. Melhorias na função neurológica neste sentido podem ser avaliadas por qualquer um de uma variedade de testes e avaliações utilizadas com este efeito por profissionais de saúde.

Basicamente o mesmo se aplica a doses e quantidades efetivas para outras lesões, disfunções, distúrbios, e doenças.

"Células EG" refere-se a células germinativas embrionárias.

"Enxerto" refere-se ao processo de contato e incorporação celular num tecido existente de interesse *in vivo*.

"População enriquecida" significa um aumento relativo do número de MAPCs relativamente a outras células ou constituintes de uma população inicial, tal como um aumento de números de MAPCs relativamente a um ou mais tipos celulares não-MAPC em cultura, tal como cultura primária, ou *in vivo*.

"Células ES" refere-se a células estaminais embrionárias.

"Expansão" refere-se à propagação de uma célula ou células sem diferenciação.

"GVHD" refere-se à doença do enxerto contra hospedeiro, o que significa processos que ocorrem essencialmente num hospedeiro imunocomprometido quando é reconhecido como estranho ("*non-self*") por células imunocompetentes de um enxerto.

"HVG" refere-se à resposta do hospedeiro contra o enxerto, o que significa processos que ocorrem quando o hospedeiro rejeita um enxerto. Tipicamente, HVG é desencadeado quando o enxerto é reconhecido como estranho ("*non-self*") por células imunocompetentes do hospedeiro.

"Hipóxia" refere-se à falta de oxigénio. Num contexto neurológico, refere-se à redução de oxigénio para o

cérebro, o que pode ocorrer apesar de um fornecimento adequado de sangue. A hipóxia pode ter origem em engasgamento, estrangulamento, sufocação, trauma na cabeça, envenenamento por monóxido de carbono, paragem cardíaca, e como complicação de anestesia geral, assim como de oclusão ou bloqueio do fluxo sanguíneo. A hipóxia cerebral leva a uma cascada de eventos que resulta em lesão celular e morte celular. A hipóxia/isquémia cerebral pode ser causada por um largo espectro de doenças que afetam o sistema de bombeamento cardiovascular ou o sistema respiratório. A hipóxia/isquémia cerebral é classificada em quatro tipos: isquémia cerebral focal, isquémia cerebral global, hipóxia cerebral difusa, e enfarte cerebral.

A isquémia cerebral focal (FCI) é causada por um trombo sanguíneo no cérebro que reduz o fluxo sanguíneo na área afetada. A gravidade da FCI varia, e frequentemente causa lesão irreversível aos neurónios sensitivos. A isquémia cerebral global (GCI) é causada por fibrilação ventricular ou assistolia cardíaca que interrompe o fluxo sanguíneo para o cérebro. A recuperação de uma GCI, que dure mais tempo que cinco a dez minutos, é problemática. A GCI mais prolongada geralmente é fatal. A hipóxia cerebral difusa (DCH) é causada por oxigenação do sangue deficiente e tipicamente resulta em hipoxémia leve a moderada. DCH pura causa disfunção cerebral mas não resulta em lesão cerebral irreversível. Pode ser causada por doença pulmonar, doença da altitude, ou grave anemia. O enfarte cerebral (CI) resulta de uma oclusão vascular focal numa área do cérebro que causa necrose.

"Enfarte", "infarte" refere-se a uma área de necrose num tecido resultante de isquémia (uma obstrução no fluxo sanguíneo) usualmente causada por um trombo ou êmbolo. Também se refere a uma obstrução do fluxo sanguíneo,

resultando em isquémia, usualmente causada por um trombo ou êmbolo.

"Imunosupressão" refere-se à prevenção, repressão, e/ou reversão de uma resposta imunitária num sujeito, tal como por exemplo uma resposta imunitária a um antigénio estranho, tal como células ou tecidos alogénicos ou xenogénicos. Em certos casos, por exemplo, é necessário o tratamento imunossupressor para suprimir uma resposta imunitária de um sujeito que seria adversa a um resultado clínico desejável do tratamento do sujeito com um transplante de células ou de um órgão.

"Isquémia" refere-se à restrição do fornecimento de sangue, tipicamente devido à oclusão de um vaso, resultando em disfunção ou lesão do tecido que o vaso ocluído abastece com oxigénio. Isquémia também se refere a um fluxo sanguíneo insuficiente para uma parte do corpo causada por constrição ou bloqueio dos vasos sanguíneos. A isquémia em tecido cerebral inicia uma cascada (referida como a cascada isquémica) que resulta na libertação de enzimas proteolíticas, espécies de oxigénio reativas, e outras substâncias que podem lesar e em última instância matar o tecido cerebral.

"Isolado" refere-se a uma célula ou células que não estão associadas a uma ou mais células ou a um ou mais componentes celulares que estão associados à célula ou células *in vivo* ou em cultura primária.

"MAPC" é o acrónimo para "célula progenitora adulta multipotente." Refere-se a não-ES, não-EG, não célula germinativa que pode dar origem a linhagens celulares de mais de uma camada germinativa, tal como todas as três camadas germinativas (i.e., endoderme, mesoderme, e

ectoderme). MAPCs também têm atividade telomerase. Elas podem ser positivas para oct-3/4 (p.ex., oct-3A humano). Elas também podem expressar um ou mais rex-1, rox-1, sox-2, SSEA-4, e/ou nanog. O termo "adulto" em MAPC não é restritivo. Apenas indica que estas células não são ES, EG, ou células germinativas. Tipicamente, como utilizado aqui, MAPC é singular e MAPCs é plural. MAPCs também têm sido referidas como células estaminais adultas multipotentes (MASCs). Ver, por exemplo, Patente U.S. n°. 7,015,037 relativamente aos métodos divulgados aqui para o isolamento e crescimento de MAPCs/MASCs, cujos métodos são meramente exemplares e ilustrativos e de nenhuma forma limitativos de tais métodos úteis de acordo com a invenção.

"MASC," ver MAPC.

"MNC" refere-se a células mononucleares.

"Modalidade" significa um tipo, abordagem, via, ou método, tal como, uma modalidade terapêutica; i.e., um tipo de terapia.

"MSC" é um acrónimo para células estaminais mesenquimais.

"Multipotente" relativamente a MAPCs, refere-se à capacidade de dar origem a linhagens celulares de mais de uma camada germinativa, tal como todas as três camadas germinativas primitivas (i.e., endoderme, mesoderme, e ectoderme) aquando da diferenciação.

"Persistência" refere-se à capacidade das células resistirem à rejeição e permanecerem e/ou aumentarem em número ao longo do tempo (p.ex., dias, semanas, meses, ou anos) *in vivo*.

"Cultura primária" refere-se á população celular obtida diretamente de um explante de material de um organismo, antes de se proceder à sub-cultura. Tipicamente, culturas primárias são criadas ao (a) isolar tecido de um organismo; (b) dissecar e/ou desagregar o tecido, e (c) permitir as células do tecido de começar a crescer, ou suspensas no meio ou, mais tipicamente, aderentes à superfície do recipiente de cultura. As culturas primárias não envolvem, e precedem, a sub-cultura das células do explante, tal como por sub-divisão e diluição das células e re-inoculando-as em meio fresco e/ou recipientes de cultura frescos. Tipicamente, uma cultura primária de células aderentes é obtida permitindo as células de migrar para fora do fragmento de tecido aderindo a um substrato apropriado ou desagregando o tecido mecanicamente ou enzimaticamente para produzir a suspensão de células, algumas das quais aderem depois ao substrato.

"Progenitor" como utilizado em células progenitoras adultas multipotentes (MAPCs) indica que estas células podem dar origem a outras células tais como células mais diferenciadas. O termo não é limitativo e não limita estas células a uma linhagem particular.

"Auto-renovação" refere-se à capacidade de produzir réplicas de células estaminais filhas com potencial de diferenciação que é idêntico àquele das que lhe deram origem. Um termo similar utilizado neste contexto é "proliferação."

"Acidente vascular cerebral" é uma lesão neurológica aguda. É causado em 80% dos casos (referido como acidente vascular cerebral isquémico) por uma perturbação do fornecimento de sangue ao cérebro que perturba (um enfarto), e tipicamente interrompe, a perfusão sanguínea do cérebro. A interrupção

pode resultar de uma perturbação do fluxo sanguíneo arterial, mas também pode resultar de uma perturbação do fluxo venoso. A parte do cérebro onde a perfusão é perturbada não recebe oxigénio adequadamente, causando lesão celular e morte. O resultado é um acidente vascular cerebral.

Acidentes vasculares cerebrais podem resultar em deficiências neurológicas transientes, deficiências permanentes ou morte. A deficiência pode ser focal ou generalizada. O acidente vascular cerebral é geralmente classificado como acidente vascular cerebral trombótico, acidente vascular cerebral embólico, hipoperfusão sistémica (acidente vascular cerebral de Watershed ou nas zonas de fronteira), ou trombose venosa. O acidente vascular cerebral trombótico é causado por um estreitamento de uma artéria devido a um trombo, usualmente envolvendo uma placa aterosclerótica. O acidente vascular cerebral embólico resulta de um bloqueio arterial devido a um êmbolo, mais frequentemente um coágulo sanguíneo.

Um "sujeito" é um vertebrado, tal como um mamífero, tal como um humano. Os mamíferos incluem, mas não estão limitados a, humanos, animais de criação, animais de desporto, e animais de estimação. Os sujeitos com necessidade de tratamento com os métodos da presente invenção incluem aqueles sofrendo de um distúrbio, disfunção, ou doença, tal como um enfarte cortical e/ou uma lesão cerebral hipóxica-isquémica, ou um efeito secundário do mesmo, ou um tratamento para este, que pode beneficiar da administração de MAPCs ou como tratamento primário ou como tratamento adjuvante.

"Transplante" como utilizado aqui significa introduzir num sujeito, células, tecidos, ou órgãos. O transplante pode

ser derivado do sujeito, de cultura, ou de uma fonte que não do sujeito.

"Tratar," "o ato de tratar," "tratamento" e semelhante está relacionado como a gestão e cuidado de um doente, particularmente no que diz respeito ao combate de um distúrbio ou doença, incluindo, mas não limitado à prevenção, melhoria, inibição, e/ou cura de uma deficiência, disfunção, distúrbio, ou doença, ou outro processo que resulta num efeito deletério, tal como, por exemplo, combatendo, prevenindo, melhorando, inibindo e/ou curando uma lesão, disfunção, distúrbio, ou doença. Ver também efetivo, quantidade efetiva, dose efetiva.

"Terapia" é sinónimo de tratamento.

Descrição da Invenção

Como descrito aqui, de acordo com certos aspetos e formas de realização da invenção, MAPCs podem ser utilizadas para tratar lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença cerebral, tal como, mas não limitado a enfartes corticais e lesão cerebral hipóxica-isquémica com ou sem tratamentos imunossuppressores adjuvantes.

Várias formas de realização da invenção põem à disposição MAPCs para utilização na exclusão, prevenção, combate, melhoria, alívio, diminuição, minimização, eliminação, e/ou cura ou semelhante de uma lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença do cérebro. Em formas de realização é uma lesão, disfunção, distúrbio; e/ou doença no e/ou do córtex do cérebro (também referido como a região cortical do cérebro). Em formas de realização é uma lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença no e/ou do cérebro. Em formas de realização é uma lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença

no e/ou do córtex cerebral. Em formas de realização é uma lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença no e/ou do hipocampo.

Em formas de realização relativamente a todos e cada um dos supracitados, entre outros, a lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença é uma lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença associada com e/ou causada por uma falta de oxigénio. Em formas de realização neste sentido a lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença é causada por hipóxia. Em formas de realização neste sentido a hipóxia é focal. Em formas de realização neste sentido a hipóxia é difusa. Em formas de realização neste sentido a doença é lesão cerebral hipóxica-isquémica.

Em formas de realização além disso relativamente ao mesmo, a lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença é uma lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença associada com e/ou causada por insuficiente fornecimento sanguíneo. Em formas de realização neste sentido a lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença é causada por uma estenose ou bloqueio arterial ou venoso, incluindo mas não limitado a um bloqueio causado por um trombo ou um êmbolo. Em formas de realização neste sentido a lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença está associada com e/ou causada por um enfarte e/ou isquémia. Em formas de realização neste sentido a lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença está associada com e/ou causada por necrose. Em formas de realização neste sentido o enfarte é um enfarte cortical. Em formas de realização neste sentido a lesão, disfunção, distúrbio, e/ou doença é um acidente vascular cerebral.

As formas de realização põem à disposição MAPCs para utilização neste sentido com tratamento e/ou terapia imunossupressora adjuvante. As formas de realização põem à

disposição MAPCs para utilização neste sentido sem tratamento imunossupressor adjuvante.

Em algumas das suas formas de realização, por isso, a invenção põe à disposição células que: (i) não são células estaminais embrionárias, não são células germinativas embrionárias, e não são células germinativas; (ii) podem diferenciar-se em pelo menos um tipo de células de cada de pelo menos duas das linhagens embrionárias endodérmica, ectodérmica, e mesodérmica; e (iii) são efetivas no tratamento de uma lesão e/ou disfunção e/ou distúrbio e/ou doença cerebral.

Em formas de realização a lesão e/ou disfunção e/ou distúrbio cerebral é causado por e/ou associado com uma falta de oxigénio. Em formas de realização é causado por ou associado com hipóxia. Em formas de realização é causado por ou associado com uma estenose ou bloqueio do fornecimento sanguíneo. Em formas de realização é ou está associado com enfarte e/ou isquémia. Em formas de realização é acidente vascular cerebral. Em formas de realização é lesão cerebral hipóxica-isquémica. Em formas de realização é ou está associado com um enfarte cortical.

Em formas de realização da invenção as células são utilizadas neste sentido isoladamente ou juntamente com outros agentes e modalidades terapêuticos como modalidades terapêuticas primárias. Em algumas formas de realização da invenção as células são utilizadas como o único agente terapêutico ou juntamente com outros agentes terapêuticos. Em algumas formas de realização da invenção as células são utilizadas, isoladamente ou com outros agentes ou modalidades terapêuticos, tanto numa ou mais modalidades terapêuticas primárias e numa ou mais modalidades terapêuticas adjuvantes.

MAPCs

Células de acordo com a invenção são descritas em maior detalhe aqui e geralmente são referidas aqui como "células progenitoras adultas multipotentes" e pelo acrónimo "MAPC" (e "MAPCs" frequentemente utilizado para o plural). É de valorizar que estas células não são ES, não são EG, e não são células germinativas, e elas têm a capacidade de se diferenciar em tipos celulares de pelo menos duas das três linhagens das camadas germinativas primitivas (ectoderme, mesoderme, e endoderme), p.ex., em células de todas as três linhagens primitivas.

MAPCs podem formar as seguintes células, por exemplo, entre outras, células mesodérmicas esplâncnicas, células musculares, células ósseas, células cartilagíneas, células endócrinas, células exócrinas, células endoteliais, células formadoras de cabelo, células formadoras de dentes, células mesodérmicas viscerais, células hematopoiéticas, células do estroma, células do estroma da medula óssea, células neuronais, células neuroectodérmicas, células epiteliais, células oculares, células pancreáticas, e células semelhantes aos hepatócitos, e células da mesma linhagem, entre muitas outras. Por exemplo, entre as células formadas por MAPCs estão osteoblastos, condroblastos, adipócitos, células do músculo-esquelético, miócitos esqueléticos, células epiteliais biliares, células dos ácinos pancreáticos, células mesangiais, células do músculo liso, células do músculo cardíaco, cardiomiócitos, osteócitos, células formadoras de vasos, oligodendrócitos, neurónios, incluindo neurónios serotonérgicos, GABAérgicos, dopaminérgicos, células gliais, células microgliais, células epiteliais pancreáticas, células epiteliais do intestino, células epiteliais do fígado, células epiteliais

da pele, células epiteliais do rim, células epiteliais renal, células dos ilhéus pancreáticos, fibroblastos, hepatócitos, e outras células da mesma linhagem que as supracitadas, entre muitas outras.

MAPCs têm atividade telomerase necessária para a auto-renovação e para evitar senescência replicativa. Geralmente elas também expressam oct-3/4. Oct-3/4 (oct-3A em humanos) é normalmente específica para ES, EG, e células germinativas. É considerada como sendo um marcador de células indiferenciadas que têm amplas capacidades de diferenciação. Também é geralmente considerado que Oct-3/4 tem um papel na manutenção de uma célula num estado indiferenciado. Oct-4 (oct-3 em humanos) é um fator de transcrição expressado no embrião antes da gastrulação, embrião nos estádios iniciais de clivagem, células da massa celular interna do blastocisto, e células do carcinoma embrionário ("EC") (Nichols, J. et al. (1998) Cell 95: 379-91), e é regulada negativamente quando as células são induzidas a diferenciar-se. O gene oct-4 (oct-3 em humanos) é transcrito em pelo menos duas variantes "*splice*" em humanos, oct-3A e oct-3B. A variante "*splice*" oct-3B é encontrada em muitas células diferenciadas enquanto que a variante "*splice*" oct-3A (também designada previamente como oct-3/4) é reportada como sendo específica para a célula estaminal embrionária indiferenciada. Ver Shimosaki et al. (2003) Development 130: 2505-12. A expressão de oct-3/4 tem um papel importante na determinação dos passos iniciais na embriogénese e diferenciação. Oct-3/4, em combinação com rox-1, causa ativação transcricional da proteína dedo de Zn rex-1, a qual também é necessária para manter células ES num estado indiferenciado (Rosfjord, E. e Rizzino, A. (1997) Biochem Biophys Res Commun 203: 1795-802; Ben-Shushan, E. et al. (1998) Mol Cell Biol 18: 1866-78).

MAPCs também podem expressar outros marcadores. Entre estes estão prex-1, rox-1, e sox-2. Rex-1 é controlado por oct-3/4, o qual ativa a expressão posterior de rex-1. Rox-1 e sox-2 são expressas em células não-ES.

Em algumas formas de realização da invenção MAPCs são utilizadas juntamente com um ou mais agentes e/ou modalidades terapêuticos como modalidade terapêutica primária. Em algumas formas de realização da invenção as células são utilizadas como uma modalidade terapêutica adjuvante, isto é, como um adjuvante de outra modalidade terapêutica primária. Em algumas formas de realização as células são utilizadas como o único agente ativo de uma modalidade terapêutica adjuvante. Em outras, as células são utilizadas como uma modalidade terapêutica adjuvante juntamente com um ou mais outros agentes ou modalidades terapêuticos. Em algumas formas de realização as células são utilizadas tanto como agentes e/ou modalidades terapêuticos primários como adjuvante. Em qualquer dos casos, as células podem ser utilizadas isoladamente na modalidade primária e/ou adjuvante. Elas também podem ser utilizadas juntamente com outros agentes ou modalidades terapêuticas, na modalidade primária ou na modalidade adjuvante ou ambas.

Como discutido anteriormente, um tratamento primário, tal como um agente terapêutico, terapia e/ou modalidade terapêutica tem como alvo (isto é, é pretendido atuar em) a disfunção primária, tal como uma doença, que é para ser tratada. Um tratamento adjuvante, tal como uma terapia e/ou uma modalidade terapêutica, pode ser administrado em combinação com um tratamento primário, tal como um agente terapêutico, terapia, e/ou modalidade terapêutica, para agir na disfunção primária, tal como uma doença, e suplementar o efeito do tratamento primário, aumentando

desse modo a eficácia global do regime de tratamento. Um tratamento adjuvante, tal como um agente, terapia, e/ou modalidade terapêutico, também pode ser administrado para agir em complicações e/ou efeitos secundários de uma disfunção primária, tal como uma doença, e/ou aqueles causados por um tratamento, tal com um agente terapêutico, terapia, e/ou modalidade terapêutica. Relativamente a qualquer destas utilizações, uma, duas, três, ou mais tratamentos primários podem ser utilizados juntamente com um, dois, três, ou mais tratamentos adjuvante.

Em algumas formas de realização as MAPCs são administradas a um sujeito antes do início de uma disfunção, tal como uma doença e/ou efeito secundário. Em formas de realização as células são administradas enquanto a disfunção se está a desenvolver. Em algumas formas de realização as células são administradas após a disfunção se ter estabelecido. As MAPCs podem ser administradas em qualquer estágio no desenvolvimento, persistência, e/ou propagação da disfunção ou após a sua recidiva.

Como discutido anteriormente, formas de realização da invenção põem à disposição células para utilização na terapia primária ou adjuvante. Em certas formas de realização da invenção, as células são administradas a um sujeito alogénico. Em algumas formas de realização elas são autólogas para o sujeito. Em algumas formas de realização elas são singénicas para o sujeito. Em algumas formas de realização as células são xenogénicas para o sujeito. Quer alogénicas, autólogas, singénicas, ou xenogénicas, em várias formas de realização da invenção as MAPCs são apenas fracamente imunogénicas ou são não-imunogénicas no sujeito. Em formas de realização as MAPCs têm suficientemente baixa imunogenicidade ou são não-imunogénicas e são suficientemente livres de respostas imunitárias deletérias

em geral, que quando administradas a sujeitos alogénicos elas podem ser utilizadas como células dadoras "universais" sem tipagem e compatibilidade tecidual. De acordo com várias formas de realização da invenção as MAPCs também podem ser armazenadas e mantidas em bancos de células, e assim podem ser mantidas disponíveis para utilização quando necessárias.

Além disso neste sentido MAPCs em várias formas de realização podem ser administradas sem tratamento imunossupressor adjuvante.

Em todos estes sentidos e outros, formas de realização da invenção põem à disposição MAPCs de mamíferos, incluindo numa forma de realização humanos, e em outras formas de realização primatas não humanos, ratos e ratinhos, e cães, porcos, cabras, ovelhas, cavalos, e vacas. As MAPCs preparadas de mamíferos como descrito anteriormente podem ser utilizadas em todos os métodos e outros aspetos da invenção descritos aqui.

MAPCs de acordo com várias formas de realização da invenção podem ser isoladas de uma variedade de compartimentos e tecidos de tais mamíferos nos quais elas são encontradas, incluindo, mas não limitado a, medula óssea, sangue periférico, sangue do cordão umbilical, sangue, baço, fígado, músculo, cérebro, tecido adiposo, placenta e outros discutidos a seguir. MAPCs em algumas formas de realização são cultivadas antes de utilizar.

Em algumas formas de realização MAPCs são modificadas por engenharia genética, de forma a melhorar as suas propriedades imunomodulatórias. Em algumas formas de realização MAPCs modificadas por engenharia genética são produzidas em cultura *in vitro*. Em algumas formas de

realização MAPCs modificadas por engenharia genética são produzidas de um organismo transgênico.

Mecanismo de ação de MAPCs

Sem ser limitado a qualquer um ou mais mecanismos explicativos das propriedades, atividades, e efeitos de MAPCs, vale a pena notar que elas podem exercer efeitos benéficos, tal como o tratamento com MAPCs, através de uma variedade de modalidades. Por exemplo, MAPCs podem ter diretamente efeitos benéficos. Tais efeitos diretos podem ser essencialmente uma questão de contato direto entre MAPCs e células de um hospedeiro. O contato pode ser com membros estruturais das células ou com constituintes no seu ambiente imediato. Tais mecanismos diretos podem envolver contato direto, difusão, absorção, ou outros processos bem conhecidos daqueles peritos na especialidade. As atividades e efeitos diretos de MAPCs podem ser limitados espacialmente, como a uma área de deposição local ou a um compartimento corporal acedido por injeção.

MAPCs também pode "*home*" em resposta a sinais de "*homing*", tal como aqueles libertados em locais de lesão ou doença. Uma vez que "*homing*" frequentemente é mediado por sinais cuja função natural é recrutar células para locais onde são necessárias reparações, o comportamento "*homing*" pode ser uma ferramenta poderosa para concentrar MAPCs em alvos terapêuticos. Este efeito pode ser estimulado por fatores específicos, como discutido a seguir.

MAPCs podem também modular efeitos benéficos, como no tratamento com MAPCs, pela sua resposta a fatores. Isto pode ocorrer adicionalmente ou alternativamente à modulação direta. Tais fatores podem incluir fatores "*homing*", mitogénios, e outros fatores estimulantes. Eles podem

também incluir fatores de diferenciação, e fatores que desencadeiam processos celulares particulares. Entre estes últimos estão fatores que provocam a secreção por parte das células de outros fatores específicos, como aqueles que estão envolvidos no recrutamento celular, tais como células estaminais (incluindo MAPCs), para um local de lesão ou doença.

MAPCs podem, adicionalmente ao precedente ou alternativamente a isso, segregar fatores que atuam em células endógenas, tal como células estaminais ou células progenitoras. Os fatores podem atuar em outras células para gerar, aumentar, diminuir, ou suprimir as suas atividades. MAPCs podem segregar fatores que atuam em células estaminais, progenitoras, ou diferenciadas provocando que estas células se dividam e/ou se diferenciem. MAPCs que "home" para um local onde é necessária reparação, podem segregar fatores tróficos que atraem outras células ao local. Desta forma, MAPCs podem atrair células estaminais, progenitoras, ou diferenciadas a um local onde elas sejam necessárias. MAPCs também podem segregar fatores que provocam que tais células se dividam ou se diferenciem.

A secreção de tais fatores, incluindo fatores tróficos, podem contribuir para a eficácia das MAPCs na, por exemplo, limitação da lesão inflamatória, limitação da permeabilidade vascular, melhoria de sobrevivência celular, e geração de e/ou no aumento de "homing" de células de reparação a locais de lesão. Tais fatores também podem afetar a proliferação das células T diretamente. Tais fatores também podem afetar células dendríticas, ao diminuir as suas atividades fagocitárias e de apresentação de antígenos, o que também pode afetar a atividade das células T.

Através destes e outros mecanismos, MAPCs podem proporcionar efeitos benéficos no tratamento de uma variedade de lesões, disfunções, distúrbios, ou doenças.

Administração MAPC

Preparações MAPC

As MAPCs podem ser preparadas de uma variedade de tecidos, tal como células de medula óssea, como discutido em maior detalhe noutra parte neste documento.

Em muitas formas de realização a pureza de MAPCs para administração a um sujeito é cerca de 100%. Em outras formas de realização é de 95% a 100%. Em algumas formas de realização é de 85% a 95%. Particularmente no caso de misturas com outras células, a percentagem de MAPCs pode ser 2%-5%, 3%-7%, 5%-10%, 7%-15%, 10%-15%, 10%-20%, 15%-20%, 20%-25%, 25%-30%, 30%-35%, 35%-40%, 40%-45%, 45%-50%, 60%-70%, 70%-80%, 80%-90%, ou 90%-95%.

O número de MAPCs num dado volume pode ser determinado por procedimentos e instrumentação bem conhecidos e rotineiros, utilizando a presença e/ou ausência de certos marcadores, incluindo aqueles descritos aqui, tal como teleomerase, e, quando desejável a capacidade de diferenciar-se em células de mais de uma das três linhagens primitivas como descrito aqui. A percentagem de MAPCs num dado volume de uma mistura de células pode ser determinada por contagem de células (tal como as células numa alíquota de uma amostra) e determinando o número de células que são MAPCs utilizando os procedimentos supracitados para identificação de MAPCs. As células podem ser contadas facilmente manualmente ou utilizando um contador de células automático. MAPCs podem ser determinadas, tal como MAPCs num dado volume, por

coloração específica, tal como com reagentes de ligação específicos, frequentemente anticorpos conjugados com um marcador fluorescente, seguido de exame visual e contagem ou de identificação automática e instrumentação de contagem, tal como por um instrumento FACS ("*fluorescence activated cell sorter*").

O tratamento de distúrbios ou doenças ou semelhantes com MAPCs pode ser com MAPCs indiferenciadas. O tratamento também pode ser com MAPCs que foram tratadas de forma a ficarem comprometidas a uma via de diferenciação. O tratamento também pode envolver MAPCs que foram tratadas para se diferenciar numa célula estaminal menos potente com potencial de diferenciação limitado. Também pode envolver MAPCs que foram tratadas para se diferenciarem num tipo celular completamente diferenciado. O melhor tipo ou mistura de MAPCs será determinado pelas circunstâncias particulares da sua utilização, e será uma questão de desenho rotineiro pelos peritos na especialidade para determinar um tipo ou combinação efetivo de MAPCs neste sentido.

Formulações

A escolha da formulação para administrar MAPCs para uma dada aplicação irá depender de uma variedade de fatores. Proeminente entre estes será a espécie do sujeito, a natureza do distúrbio, disfunção, ou doença a ser tratada e o seu estado e distribuição no sujeito, a natureza de outras terapias e agentes que estão a ser administrados, a melhor via para administração das MAPCs, sobrevivência das MAPCs através da via, o regime de dosagem, e outros fatores que irão ser aparentes para os peritos na especialidade. Em particular, por exemplo, a escolha de agentes de transporte

apropriados e outros aditivos irá depender da via exata de administração e a natureza da forma de dosagem particular.

A sobrevivência celular pode ser um determinante importante da eficácia de terapias utilizando MAPCs. Isto é verdade para tanto terapias primárias e adjuvantes. Outra preocupação surge quando os locais alvo são inóspitos para a inoculação celular e crescimento celular. Isto pode impedir o acesso ao local e/ou o enxerto nesse local de MAPCs terapêuticos. Em formas de realização, a invenção compreende a utilização de medidas para aumentar a sobrevivência celular e/ou para superar problemas colocados por barreiras à inoculação e/ou crescimento.

Exemplos de composições compreendendo MAPCs incluem preparações líquidas, incluindo soluções, suspensões, e preparações para administração intramuscular ou intravenosa (p.ex., administração injetável), tal como suspensões ou emulsões estéreis. Tais composições podem compreender uma mistura de MAPCs com um agente de transporte, diluente, ou excipiente apropriado tal como água estéril, soro fisiológico, glucose, dextrose, ou semelhante. As composições podem também ser liofilizadas. As composições podem conter substâncias auxiliares tais como agentes molhantes ou emulsionantes, agentes tamponizantes de pH, aditivos promotores da gelificação ou viscosidade, conservantes, aromatizantes, corantes, e semelhantes, dependendo da via de administração e a preparação desejada. Textos padrão, tal como "REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE," 17^a edição, 1985, podem ser consultados para preparar preparações apropriadas, sem experiências indevidas.

As composições da invenção frequentemente são convenientemente postas à disposição como preparações

líquidas, p.ex., soluções aquosas isotónicas, suspensões, emulsões, ou composições viscosas, que podem ser tamponadas a um pH selecionado. As preparações líquidas são normalmente mais fáceis de preparar que géis, outras composições viscosas, e composições sólidas. Adicionalmente, as composições líquidas são de certa forma mais convenientes de administrar, especialmente por injeção. Composições viscosas, por outro lado, podem ser formuladas dentro do intervalo de viscosidade apropriado para proporcionar um maior período de contato com tecidos específicos.

Vários aditivos serão frequentemente incluídos para aumentar a estabilidade, esterilidade, e isotonicidade das composições, tal como preservadores antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, e tampões, entre outros. A prevenção da ação de microrganismos pode ser assegurada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, e semelhantes. Em muitos casos, será desejável incluir agentes isotónicos, por exemplo, açúcares, cloreto de sódio, e semelhantes. A absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser adquirida através da utilização de agentes que retardam a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio, e gelatina. De acordo com a presente invenção, no entanto, qualquer veículo, diluente, ou aditivo utilizado tem de ser compatível com as células.

Soluções, suspensões, e géis de MAPS frequentemente contêm uma quantidade substancial de água (preferivelmente purificada, água esterilizada) adicionalmente às células. Também podem estar presentes pequenas quantidades de outros ingredientes como reguladores de pH (p.ex., uma base tal como NaOH), emulsionantes ou agentes dispersantes, agentes

tamponizantes, conservantes, agentes molhantes e agentes gelificantes (p.ex., metilcelulose).

Frequentemente as composições irão ser isotónicas, i.e., elas irão ter a mesma pressão osmótica que o sangue e fluído lacrimal quando corretamente preparadas para administração.

A isotonicidade desejada das composições da invenção pode ser alcançada utilizando cloreto de sódio, ou outros agentes farmacologicamente aceitáveis tal como dextrose, ácido bórico, tartarato de sódio, propilenoglicol, ou outros solutos inorgânicos ou orgânicos. O cloreto de sódio é preferido particularmente para tampões contendo íons de sódio.

A viscosidade das composições, se desejado, pode ser mantida ao nível selecionado utilizando um agente espessante farmacologicamente aceitável. É preferido metilcelulose porque está facilmente e economicamente disponível e é fácil de trabalhar com ela. Outros agentes espessantes apropriados incluem, por exemplo, goma xantana, carboximetilcelulose, hidroxipropilcelulose, carbómero, e semelhantes. A concentração preferida do agente espessante irá depender do agente selecionado. O ponto importante é utilizar uma quantidade que irá alcançar a viscosidade selecionada. As composições viscosas são normalmente preparadas a partir de soluções através da adição de tais agentes espessantes.

Um conservante ou estabilizador das células farmacologicamente aceitável pode ser utilizado para aumentar o tempo de vida das composições MAPC. Se tais conservantes forem incluídos, está bem dentro do alcance do

especialista qualificado o selecionar composições que não irão afetar a viabilidade ou eficácia das MAPCs.

Os peritos na especialidade irão reconhecer que os componentes das composições devem ser quimicamente inertes. Isto não será um problema para os peritos nos princípios químicos e farmacêuticos. Podem ser facilmente evitados problemas através de referência a textos padrão ou com simples experiências (não envolvendo experiências indevidas) utilizando informação disponibilizada pela divulgação, os documentos citados aqui, e geralmente disponíveis na especialidade.

Soluções estéreis injetáveis podem ser preparadas incorporando as células utilizadas praticando a presente invenção na quantidade necessária do solvente apropriado com várias quantidades dos outros ingredientes, como desejado.

Também preferido são soluções para injeção, incluindo injeção e infusão estereotóxica, tal como infusão IV.

Em algumas formas de realização, são formuladas MAPCs numa forma injetável de dose unitária, tal como uma solução, suspensão, ou emulsão. As formulações farmacêuticas apropriadas para injeção de MAPCs tipicamente são soluções aquosas estéreis e dispersões. Agentes de transporte para formulações injetáveis podem ser um solvente ou um meio dispersante contendo, por exemplo, água, solução salina, solução tampão salina de fosfato, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol, polietilenoglicol líquido, e semelhantes), e misturas apropriadas destes.

O especialista qualificado pode facilmente determinar a quantidade de células e aditivos, veículos, e/ou agentes de

transporte opcionais em composições a serem administradas em métodos da invenção. Tipicamente, qualquer aditivo (adicionalmente às células) estão presentes numa quantidade de 0,001 a 50% em peso em solução, tal como em solução tampão salina de fosfato. O princípio ativo está presente na ordem de microgramas a miligramas, tal como cerca de 0,0001 a cerca de 5% em peso, preferencialmente cerca de 0,0001 a cerca de 1% em peso, mais preferencialmente cerca de 0,0001 a cerca de 0,05% em peso ou cerca de 0,001 a cerca de 20% em peso, preferivelmente cerca de 0,01 a cerca de 10% em peso, e mais preferivelmente cerca de 0,05 a cerca de 5% em peso.

Para qualquer composição a ser administrada a um animal ou humano, e para qualquer método particular de administração, é preferido determinar por isso: toxicidade, tal como determinando a dose letal (LD) e LD50 num modelo animal apropriado, p.ex., roedor tal como ratinho ou rato; e, a dosagem da(s) composição(ões), concentração dos componentes aqui, e momento de administração da(s) composição(ões), que suscita uma resposta apropriada. Tais determinações não necessitam de experiências indevidas do conhecimento do especialista qualificado, desta divulgação, e dos documentos citados aqui. E, o tempo para administrações sequenciais pode ser averiguado sem experiências indevidas.

Em algumas formas de realização as MAPCs são encapsuladas para a administração, particularmente quando o encapsulamento aumenta a eficácia da terapia, ou proporciona vantagens no manuseamento e/ou duração na armazenagem. O encapsulamento em algumas formas de realização onde aumenta a eficácia de imunossupressão mediada por MAPC pode, como resultado, também reduzir a necessidade de terapia com fármacos imunossupressores.

Também, o encapsulamento em algumas formas de realização proporciona uma barreira relativamente ao sistema imunitário de um sujeito, o que pode reduzir ainda mais a resposta imunitária de um sujeito aos MAPCs (que geralmente não são imunogénicos ou são apenas fracamente imunogénicos em transplantes alogénicos), reduzindo desse modo qualquer rejeição do enxerto ou inflamação que possa ocorrer após a administração das células.

Numa variedade de formas de realização onde MAPCs são administradas em mistura com células de outro tipo, que são tipicamente mais imunogénicas num ambiente alogénico ou xenogénico, o encapsulamento pode reduzir ou eliminar respostas imunitárias adversas do hospedeiro a células não-MAPC e/ou GVHD que pode ocorrer num hospedeiro imunocomprometido se a mistura de células for imunocompetente e reconhecer o hospedeiro como "*non-self*".

MAPCs podem ser encapsuladas por membranas, assim como por cápsulas, antes da implantação. É contemplado que quaisquer dos muitos métodos de encapsulamento de células disponíveis podem ser utilizados. Em algumas formas de realização, as células são encapsuladas individualmente. Em algumas formas de realização, muitas células são encapsuladas dentro da mesma membrana. Em formas de realização nas quais as células são para serem removidas a seguir à implantação, uma estrutura relativamente de grande tamanho a encapsular muitas células, tal como dentro de uma membrana única, pode proporcionar uma forma conveniente de recuperação.

Podem ser utilizados uma larga variedade de materiais em várias formas de realização para microencapsulamento de MAPCs. Tais materiais incluem, por exemplo, cápsulas de polímeros, microcápsulas de alginato-poli-L-lisina-alginato, cápsulas de bário poli-L-lisina alginato,

cápsulas de bário alginato, fibras ocas de poliacrilonitrilo/cloreto de polivinilo (PAN/PVC) e fibras ocas de polietersulfona (PES).

As técnicas para microencapsulamento de células que podem ser utilizadas para administração de MAPCs são conhecidas dos peritos na especialidade e são descritos, por exemplo, em Chang, P., *et al.*, 1999; Matthew, H.W., *et al.*, 1991; Yanagi, K., *et al.*, 1989; Cai Z.H., *et al.*, 1988; Chang, T.M., 1992 e na patente U.S. nº. 5,639,275 (a qual, por exemplo, descreve uma cápsula biocompatível para conservação a longo prazo de células que expressam estavelmente moléculas biologicamente ativas). Métodos adicionais de encapsulamento são encontrados na publicação da patente europeia nº. 301,777 e patentes U.S. nºs. 4,353,888; 4,744,933; 4,749,620; 4,814,274; 5,084,350; 5,089,272; 5,578,442; 5,639,275; e 5,676,943.

Certas formas de realização incorporam MAPCs num polímero, tal como um biopolímero ou um polímero sintético. Exemplos de biopolímeros incluem, mas não estão limitadas a, fibronectina, fibrina, fibrinogénio, trombina, colagénio, e proteoglicanos. Outros fatores, tais como as citocinas discutidas anteriormente, também podem ser incorporados no polímero. Em outras formas de realização da invenção, MAPCs podem ser incorporadas no interstício de um gel tridimensional. Um grande polímero ou gel, tipicamente, irá ser implantado cirurgicamente. Um polímero ou gel que pode ser formulado em partículas ou fibras suficientemente pequenas pode ser administrado por outras vias comuns, mais conveniente, não cirúrgicas.

As composições farmacêuticas da invenção podem ser preparadas em muitas formas que incluem comprimidos, cápsulas duras ou moles de gelatina, soluções aquosas,

suspensões, e lipossomas e outras formulações de libertação prolongada, tais como géis poliméricos moldados. Composições farmacêuticas líquidas orais podem ser sob a forma de, por exemplo, suspensões aquosas ou oleosas, soluções, emulsões, xaropes, ou elixires, ou podem estar presentes como produto seco para constituição com água ou outro veículo apropriado antes da utilização. Tais composições farmacêuticas líquidas podem conter aditivos convencionais tais como agentes de suspensão, agente emulsionante, veículos não aquosos (que podem incluir óleos comestíveis), ou conservantes. Uma forma farmacêutica oral pode ser formulada de tal forma que as células são libertadas no intestino depois de passar através do estômago. Tais formulações são descritas na patente U.S. nº. 6,306,434 e nas referências contidas aqui.

Composições farmacêuticas apropriadas para administração retal podem ser preparadas como supositórios de dose unitária. Agentes de transporte apropriados incluem solução salina e outros materiais geralmente utilizados na especialidade.

Para administração por inalação, as células podem ser convenientemente administradas através de um insuflador, nebulizador, ou uma embalagem pressurizada ou outras formas convenientes de administração de um nebulizador de aerossol. Embalagens pressurizadas podem compreender um propulsor apropriado tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono, ou outro gás apropriado. No caso de um aerossol pressurizado, a unidade de dose pode ser determinada providenciando uma válvula para administrar uma quantidade doseada.

Alternativamente, para administração por inalação ou insuflação, um meio pode tomar a forma de uma composição com pó seco, por exemplo, uma mistura de pó de um modulador ou uma base de pó apropriada tal como lactose ou amido. A composição de pó pode ter uma apresentação em forma de dose unitária, por exemplo, cápsulas ou cartuchos ou, p.ex., gelatina ou embalagem de *blisters*, dos quais o pó pode ser administrado com a ajuda de um inalador ou insuflador. Para administração intra-nasal, as células podem ser administrada via um nebulizador líquido, tal como via um pulverizador em frasco de plástico.

Outros princípios ativos

As MAPCs podem ser administradas com outros agentes farmacologicamente ativos. Em algumas formas de realização um ou mais tais agentes são formulados juntamente com MAPCs para administração. Em algumas formas de realização as MAPCs e um ou mais agentes estão em formulações separadas. Em algumas formas de realização as composições compreendendo as MAPCs e/ou o ou mais agentes são formuladas no sentido de utilização adjuvante de um com o outro.

As MAPCs podem ser administradas numa formulação contendo agentes imunossuppressores, tal como qualquer combinação de qualquer número de um corticosteroide, ciclosporina A, um agente imunossupressor semelhante à ciclosporina, ciclofosfamida, globulina antitímócito, azatioprina, FK-506, e um agente imunossupressor semelhante a um macrólido que não o FK-506, e rapamicina. Em certas formas de realização, tais agentes incluem um corticosteroide, ciclosporina A, azatioprina, ciclofosfamida, rapamicina e/ou FK-506. Agentes imunossuppressores de acordo com o supracitado podem ser o único tal agente adicional ou podem

ser combinados com outros agentes, tal como outros agentes mencionados aqui. Outros agentes imunossupressores incluem tacrolimus, micofenolato de mofetil, e sirolimus.

Tais agentes também incluem agentes antibióticos, agentes antifúngicos, e agentes antivirais, para nomear apenas algumas outras substâncias e composições farmacologicamente ativas que podem ser utilizadas de acordo com formas de realização da invenção.

Antibióticos típicos ou compostos anti-micóticos incluem, mas não estão limitados a, penicilina, estreptomicina, anfotericina, ampicilina, gentamicina, canamicina, ácido micofenólico, ácido nalidíxico, neomicina, nistatina, paromomicina, polimixina, puromicina, rifampicina, espectinomicina, tetraciclina, tilosina, zeocina, e cefalosporinas, aminoglicosídeos, e equinocandinas.

Outros aditivos deste tipo relacionam-se com o fato de que as MAPCs, como outras células estaminais, a seguir à administração a um sujeito podem "*home*" num meio favorável ao seu crescimento e função. Tal "*homing*" frequentemente concentra as células em locais onde elas são necessárias, tal como locais de distúrbio, disfunção, ou doença do sistema imunitário. É conhecido que um número de substâncias estimula "*homing*". Elas incluem fatores de crescimento e agentes de sinalização tróficos, tal com as citocinas. Elas também podem ser utilizadas para promover "*homing*" das MAPCs para os locais alvo terapeuticamente. Elas podem ser administradas a um sujeito antes do tratamento com MAPCs, juntamente com MAPCs, ou após as MAPCs serem administradas.

Certas citocinas, por exemplo, alteram ou afetam a migração de MAPCs ou dos seus homólogos diferenciados a

locais onde há necessidade de terapia, tal como locais imunocomprometidos. As citocinas que podem ser utilizadas neste sentido incluem, mas não estão limitadas a, factor-1 derivado de células do estroma (SDF-1), fator de células estaminais (SCF), angiopoietina-1, fator de crescimento derivado da placenta (PIGF), fator estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF), citocinas que estimulam a expressão de moléculas de adesão endotelial tais como ICAMs e VCAMs, e citocinas que geram ou facilitam "*homing*".

Elas podem ser administradas a um sujeito como um pré-tratamento, juntamente com MAPCs, ou após as MAPCs terem sido administradas, para promover "*homing*" aos locais desejados e para alcançar uma melhoria do efeito terapêutico, ou por melhoria do "*homing*" ou por outro mecanismo. Tais fatores podem ser combinados com MAPCs numa formulação apropriada para elas serem administradas conjuntamente. Alternativamente, tais fatores podem ser formulados e administrados separadamente.

A ordem de administração, formulações, doses, frequência da dosagem, e vias de administração de fatores (tais como as citocinas discutidas anteriormente) e MAPCs geralmente irá variar com o distúrbio ou doença a ser tratada, a sua gravidade, o sujeito, outras terapias que estão a ser administradas, o estágio do distúrbio ou doença, e fatores de prognóstico, entre outros. Regimes gerais que foram estabelecidos para outros tratamentos proporcionam um enquadramento para determinar a dosagem apropriada na terapia direta mediado por MAPC ou adjuvante. Estes, juntamente com a informação aqui disponibilizada, irão permitir ao especialista qualificado determinar procedimentos de administração apropriados de acordo com formas de realização da invenção, sem experiências indevidas.

Em formas de realização as células são formuladas apropriadamente para o tratamento de lesão cerebral, incluindo as lesões e/ou disfunções e/ou distúrbios e/ou doenças cerebrais aqui estipuladas. Em formas de realização, as formulações são eficazes na administração parentérica. Em formas de realização as formulações são eficazes na administração I.V.. Em formas de realização as formulações são eficazes na injeção estereotáxica.

Vias

As MAPCs podem ser administradas a um sujeito por qualquer uma de uma variedade de vias conhecidas pelos peritos na especialidade que podem ser utilizadas para administrar células a um sujeito.

Em várias formas de realização as MAPCs são administradas a um sujeito por qualquer via para distribuição efetiva de terapêuticas com células. Em algumas formas de realização as células são administradas por injeção, incluindo injeção local e/ou sistêmica. Em certas formas de realização as células são administradas no e/ou na proximidade do local com a disfunção que se tenciona tratar. Em algumas formas de realização, as células são administradas por injeção num local que não está na proximidade de local da disfunção. Em algumas formas de realização as células são administradas através de injeção sistêmica, tal como injeção intravenosa.

As MAPCs podem ser para administração por via parentérica. Vias parentéricas de administração úteis em várias formas de realização da invenção incluem, entre outras, administração através de injeção intravenosa, intra-arterial, intracardiaca, intra-espinhal, intratecal, intra-óssea, intra-articular, intra-sinovial, intra-cutânea,

intradérmica, subcutânea, e/ou intramuscular. Em algumas formas de realização é utilizada injeção intravenosa, intra-arterial, intra-cutânea, intradérmica, subcutânea e/ou intramuscular. Em algumas formas de realização é utilizado injeção intravenosa, intra-arterial, intra-cutânea, subcutânea, e/ou intramuscular.

Em várias formas de realização da invenção as MAPCs são administradas por injeção sistêmica. A injeção sistêmica, tal como a injeção intravenosa, oferece uma das vias mais simples e menos invasivas de administração de MAPCs. Em alguns casos, estas vias podem necessitar de doses altas de MAPC para a otimização da eficácia e/ou "*homing*" das MAPCs para o local alvo. Numa variedade de formas de realização as MAPCs podem ser administradas através de injeções direcionadas e/ou localizadas para assegurar o melhor efeito nos locais alvo.

As MAPCs podem ser administradas ao sujeito através de uma agulha hipodérmica com uma seringa em algumas formas de realização da invenção. Em várias formas de realização, as MAPCs são administradas ao sujeito através de um catéter. Numa variedade de formas de realização, as MAPCs são administradas por implantação cirúrgica. Além disso neste sentido, em várias formas de realização da invenção, as MAPCs são administradas ao sujeito por implantação utilizando um procedimento artroscópico. Em algumas formas de realização as MAPCs são administradas ao sujeito por injeção estereotáxica. Em algumas formas de realização as MAPCs são administradas ao sujeito num ou sobre um suporte sólido, tal como um polímero ou gel. Em várias formas de realização, as MAPCs são administradas ao sujeito numa forma encapsulada.

Em formas de realização adicionais da invenção, as MAPCs são formuladas apropriadamente para administração oral, retal, epicutânea, ocular, nasal, e/ou pulmonar e são administradas em conformidade.

Em formas de realização é utilizada a administração parentérica para tratamento de lesão cerebral, incluindo as lesões e/ou disfunções e/ou distúrbios e/ou doenças cerebrais aqui estipuladas. Em formas de realização, é utilizada infusão I.V.. Em formas de realização é utilizada injeção estereotáxica.

Dosagem

As composições podem ser administradas em dosagens e através de técnicas bem conhecidas dos qualificados nas especialidades médicas e veterinárias tendo em consideração tais fatores como idade, sexo, peso, e condição do doente particular, e a formulação que será administrada (p.ex., sólida versus líquida). As doses para humanos ou outros mamíferos podem ser determinadas, sem experiências indevidas, pelo especialista qualificado, a partir desta divulgação, dos documentos citados aqui, e do conhecimento na especialidade.

A dose de MAPCs apropriada a ser utilizada de acordo com várias formas de realização da invenção irá depender de numerosos fatores. Pode variar consideravelmente para circunstâncias diferentes. Os parâmetros que irão determinar a otimização das doses de MAPCs a serem administradas para terapia primária e adjuvante geralmente irá incluir alguns ou todos dos seguintes: a doença a ser tratada e o seu estágio; a espécie do sujeito, a sua saúde, género, idade, peso, e taxa metabólica; a imunocompetência do sujeito; outras terapias a serem administradas; e

complicações potenciais esperadas da história ou genótipo do sujeito. Os parâmetros podem também incluir: se as MAPCs são singénicas, autólogas, alogénicas, ou xenogénicas; a sua potência (atividade específica); o local e/ou distribuição que tem de ser selecionado para as MAPCs serem efetivas; e tais características do local como acessibilidade para as MAPCs e/ou o enxerto de MAPCs. Parâmetros adicionais incluem co-administração de MAPCs com outros fatores (tal como fatores de crescimento e citocinas). A dose otimizada numa dada situação também irá ter em consideração a forma em que as células são formuladas, a forma em que elas são administradas, e o grau com que as células se irão localizar nos locais alvo após a administração. Finalmente, a determinação da dosagem otimizada necessariamente irá estabelecer uma dose efetiva que não está nem abaixo do limiar de máximo efeito benéfico nem acima do limiar em que os efeitos deletérios associados com a dose de MAPCs ultrapassam as vantagens do aumento da dose.

A dose otimizada de MAPCs para algumas formas de realização será na ordem das doses utilizadas para o transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea. Pode ser estimado por extrapolação de estudos animais tendo em consideração diferenças em tamanho (massa) e fatores metabólicos, e de requisitos de dosagem estabelecidos para outras terapias com células, tal como terapias de transplante.

Em formas de realização as doses otimizadas variam entre 10^4 to 10^9 MAPC células/kg de massa do destinatário por administração. Em formas de realização as doses otimizadas por administração será entre 10^5 e 10^8 MAPC células/kg. Em formas de realização as dose otimizadas por administração será 5×10^5 a 5×10^7 MAPC células/kg. Em formas de

realização as doses otimizadas por administração será entre qualquer 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou 9×10^6 a qualquer 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou 9×10^7 .

Para referência, algumas das doses médias-altas do supracitado são análogas às doses de células nucleadas utilizadas no transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea. Algumas das doses médias-baixas são análogas ao número de $CD34^+$ células/kg utilizadas no transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea.

É de valorizar que uma dose única possa ser administrada toda de uma vez, fracionada, ou continuamente por um período de tempo. A dose total também pode ser administrada numa única localização ou distribuída fracionada por vários locais.

Em várias formas de realização, as MAPCs podem ser administradas numa dose inicial, e depois mantida através de mais administrações de MAPCs. As MAPCs podem ser administradas através de um método inicialmente, e depois administradas através do mesmo método ou um ou mais métodos diferentes. Os níveis de MAPC do sujeito podem ser mantidos através de uma administração contínua das células. Várias formas de realização administram as MAPCs ou inicialmente ou para manter o seu nível no sujeito, ou ambas por injeção intravenosa. Numa variedade de formas de realização, outras formas de administração são utilizadas, dependendo da condição do doente e outros fatores, discutido noutra parte neste documento.

É de referir que os sujeitos humanos são tratados geralmente durante mais tempo que animais experimentais; mas, o tratamento geralmente tem uma duração proporcional à

duração do processo da doença e a efetividade do tratamento. Os peritos na especialidade irão ter isso em consideração na utilização dos resultados de outros procedimentos realizados em humanos e/ou em animais, tal como ratos, ratinhos, primatas não humanos, e semelhantes, para determinar doses apropriadas para humanos. Tais determinações, baseadas nestas considerações e tendo em consideração as orientações fornecidas pela presente divulgação e o estado da técnica, irá permitir ao especialista qualificado fazê-lo sem experiências indevidas.

Regimes apropriados para administração inicial e doses posteriores ou para administração sequencial podem ser todos os mesmo ou podem ser variáveis. Regimes apropriados podem ser determinados pelo especialista qualificado, a partir desta divulgação, dos documentos citados aqui, e do conhecimento da especialidade.

A dose, frequência, e duração do tratamento irá depender de muitos fatores, incluindo a natureza da doença, o sujeito, e outras terapias que podem ser administradas. Por conseguinte, pode ser utilizada uma larga variedade de regimes para administrar MAPCs.

Em algumas formas de realização as MAPCs são administradas a um sujeito em uma dose. Em outras MAPCs são administradas a um sujeito numa série de duas ou mais doses em sucessão. Em algumas outras formas de realização em que as MAPCs são administradas numa dose única, em duas doses, e/ou mais de duas doses, as doses podem ser as mesmas ou diferentes, e elas são administradas em intervalos iguais ou desiguais entre elas.

As MAPCs podem ser administradas com muitas frequências ao longo de uma ampla variedade de tempo, tal como até ser alcançado um desejado efeito terapêutico. Em algumas formas de realização, as MAPCs são administradas ao longo de um período menor que um dia. Em outras formas de realização elas são administradas ao longo de dois, três, quatro, cinco, ou seis dias. Em algumas formas de realização as MAPCs são administradas uma ou mais vezes por semana, por um período de semanas. Em outras formas de realização elas são administradas por um período de semanas em um ou vários meses. Em várias formas de realização elas podem ser administradas por um período de meses. Em outras elas podem ser administradas ao longo de um período de um ou mais anos. Geralmente, as durações dos tratamentos irão ser proporcionais à duração do processo de doença, a efetividade das terapias a serem administradas, e a condição e a resposta do sujeito a ser tratado.

Em algumas formas de realização, as MAPCs são administradas uma vez, duas vezes, três vezes, ou mais de três vezes até ser alcançado o desejado efeito terapêutico ou parecer que não é mais provável que a administração proporcione um benefício ao sujeito. Em algumas formas de realização as MAPCs são administradas continuamente ao longo de um período de tempo, tal como através de uma infusão intravenosa. A administração de MAPCs pode ser por um curto período de tempo, durante dias, durante semanas, durante meses, durante anos, ou ao longo de maiores períodos de tempo.

Em formas de realização, é administrado um único bólus para o tratamento de lesões cerebrais, incluindo as lesões e/ou disfunções e/ou distúrbios e/ou doenças cerebrais aqui estipuladas. Em formas de realização são administradas duas ou mais administrações de um único bólus separados no tempo

por um ou mais dias. Em formas de realização cada dose é administrada através de infusões I.V. ao longo de qualquer período de tempo entre vários minutos até várias horas. Em formas de realização uma única dose de células é administrada através de injeção estereotáxica. Em formas de realização, duas ou mais doses são administradas na mesma ou em diferentes áreas do cérebro através de injeção estereotáxica. Em formas de realização envolvendo injeção de bólus, IV, e estereotáxica para o tratamento de lesão cerebral neste sentido, a dose de células por administração é de 10^4 a 10^9 MAPC células/kg de massa do destinatário por administração. Em formas de realização a dose é de 10^5 a 10^8 MAPC células/kg. Em formas de realização a dose é de 5×10^5 a 5×10^7 MAPC células/kg. Em formas de realização a dose é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou 9×10^6 a qualquer 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou 9×10^7 .

MAPCs como descrito na patente U.S. n°. 7,015,037

MAPCs humanas são descritas na especialidade. Métodos de isolamento de MAPC para humanos e ratos são conhecidos na especialidade. É por isso possível para um perito na especialidade obter aspirados de medula óssea, biópsias cerebrais ou hepáticas, e outros órgãos, e isolar as células utilizando técnicas de seleção positivas e/ou negativas disponíveis para os peritos na especialidade, baseando-se nos genes que são expressos (ou não expressos) nestas células (p.ex., através de exames funcionais ou morfológicos tais como aqueles divulgados nos requerimentos acima referidos). Métodos ilustrativos são descritos na, por exemplo, patente U.S. n°. 7,015,037.

Isolamento e crescimento de MAPCs como descrito na patente U.S. n°. 7,015,037

Métodos de isolamento de MAPC são conhecidos na especialidade a partir de, por exemplo, humanos, ratos, ratinhos, cão e porco. Métodos ilustrativos são descritos na, por exemplo, patente US nº. 7,015,037 e PCT/US02/04652 (publicada como WO 02/064748), e estes métodos, juntamente com a caracterização de MAPCs aqui divulgada, são apenas como forma de ilustração e de exemplos não limitantes.

MAPCs foram inicialmente isoladas de medula óssea, e foram subsequentemente adquiridas de outros tecidos, incluindo cérebro e músculo (Jiang, Y. *et al.*, 2002). MAPCs podem ser isoladas de muitas fontes, incluindo, mas não limitado a medula óssea, placenta, cordão umbilical e sangue do cordão umbilical, músculo, cérebro, fígado, espinal medula, sangue, tecido adiposo e pele. Por exemplo, MAPCs podem ser derivadas de aspirados de medula óssea, que podem ser obtidos através de meios padrão disponíveis para os peritos na especialidade (ver, por exemplo, Muschler, G.F., *et al.*, 1997; Batinic, D., *et al.*, 1990).

Fenótipo de MAPC humana sob condições estipuladas na patente U.S. nº. 7,015,037

A análise imunofenotípica com FACS de MAPCs humanas obtidas após 22-25 duplicações celulares indicou que as células não expressam CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD50, CD62E e -P, HLA-DR, Muc18, STRO-1, cKit, Tie/Tek; e expressam baixos níveis de CD44, HLA classe I, e microglobulina $\beta 2$, mas expressam CD10, CD13, CD49b, CD49e, CDw90, Flkl (N>10).

Quando as células realizaram >40 duplicações em culturas re-inoculadas a cerca de $2 \times 10^3/\text{cm}^2$, o fenótipo tornou-se mais homogêneo, e nenhuma célula expressou HLA classe I ou CD44 (n=6). Quando as células cresciam numa maior confluência, elas expressavam elevados níveis de Muc18,

CD44, HLA classe I, e microglobulina $\beta 2$ -, que é similar ao fenótipo descrito para MSC (N=8) (Pittenger, 1999).

A imunohistoquímica mostrou que MAPCs humanas que cresceram a cerca de $2 \times 10^3/\text{cm}^2$ densidade de inoculação expressaram EGF-R, TGF-R1 e -2, BMP-R1A, PDGF-R1a e -B, e que uma pequena sub-população (entre 1 e 10%) de MAPCs corou com anticorpos anti-SSEA4 (Kannagi, R, 1983).

Utilizando vetores de cDNA Clontech foi determinado o perfil de genes expressados por MAPCs humanas cultivadas em densidades de inoculação de cerca de 2×10^3 células/ cm^2 para 22 e 26 duplicações celulares:

A. MAPCs não expressaram CD31, CD36, CD62E, CD62P, CD44-H, cKit, Tie, recetores para IL1, IL3, IL6, IL11, G CSF, GM-CSF, Epo, Flt3-L, ou CNTF, e baixos níveis de HLA-classe-I, CD44-E e mRNA Muc-18.

B. MAPCs expressaram mRNA para as citocinas BMP1, BMP5, VEGF, HGF, KGF, MCP1; os recetores das citocinas Flk1, EGF-R, PDGF-R1 α , gp130, LIF-R, ativina-R1 e -R2, TGFR-2, BMP-R1A; os recetores de adesão CD49c, CD49d, CD29; e CD10.

C. MAPCs expressaram mRNA para hTERT e TRF1; o domínio POU do fator de transcrição oct-4, sox-2 (necessário com oct-4 para manter o estado indiferenciado de ES/EC, Uwanogho D., 1995), sox 11 (desenvolvimento neuronal), sox 9 (condrogénese) (Lefebvre V., 1998); fatores de transcrição de homedomínio: Hox-a4 e -a5 (especificações do esqueleto cervical e torácico; organogénese do trato respiratório) (Packer AI, 2000), Hox-a9 (mielopoiese) (Lawrence H, 1997), Dlx4 (especificação de cérebro anterior e estruturas periféricas da cabeça) (Akimenko MA, 1994), MSX1 (mesoderme embrionária, coração e músculo adulto, condrogénese e

osteogénese) (Foerst-Potts L. 1997), PDX1 (pâncreas) (Offield MF, 1996).

D. Presença de oct-4, LIF-R, e mRNA hTERT foi confirmada por RT-PCR.

E. Além disso, RT-PCR mostrou que mRNA rex-1 e mRNA rox-1 eram expressados em MAPCs.

Oct-4, rex-1 e rox-1 foram expressos em MAPCs derivadas de medula óssea humana e murina e de fígado e cérebro murino. MAPCs humanas expressaram LIF-R e coraram positivamente com SSEA-4. Finalmente, foi descoberto que os níveis de oct-4, LIF-R, rex-1 e mRNA rox-1 aumentam em MAPCs humanas cultivadas para além das 30 duplicações celulares, o que resultou em células fenotipicamente mais homogêneas. Em contraste, MAPCs cultivadas a elevadas densidades perderam a expressão destes marcadores. Isto foi associado com senescência antes de 40 duplicações celulares e perda de diferenciação para células que não condroblastos, osteoblastos, e adipócitos. Assim, a presença de oct-4, combinada com rex-1, rox-1, e sox-2, estava correlacionada com a presença das células mais primitivas em culturas MAPCs.

Métodos de cultivo de MAPCs são bem conhecidos na especialidade. (Ver por exemplo, patente U.S. nº. 7,015,037). A densidade de inoculação MAPCs pode variar entre cerca de 100 células/cm² ou cerca de 150 células/cm² até cerca de 10.000 células/cm², incluindo cerca de 200 células/cm² até cerca de 1500 células/cm² até cerca de 2000 células/cm². A densidade pode variar entre espécies. Adicionalmente, a densidade otimizada pode variar dependendo das condições de cultura e fonte das células. Está dentro das competências do especialista comum

determinar a densidade otimizada para um dado conjunto de condições de cultura e células.

Também, concentrações de oxigênio atmosférico efetivas de menos de cerca de 10%, incluindo cerca de 3 to 5%, podem ser utilizadas em qualquer altura durante o isolamento, crescimento, e diferenciação das MAPCs em cultura.

A presente invenção é adicionalmente descrita através dos seguintes exemplos ilustrativos, não limitativos.

Exemplos

EXEMPLO 1: Lesão hipóxica-isquêmica com MAPCs em ratos e tratamento com MAPCs e imunossupressão

Crias de ratos Sprague Dawley (SD) de sete dias de idade (n=7 por grupo teste) foram sujeitas a lesão HI pelo método de laqueação da carótida unilateral seguido de 8% hipóxia, como descrito em Rice et al., Ann Neurol. 9: 131-141 (1981), que é aqui incorporado para fins de referência na sua totalidade especialmente relativamente a este método. Sete dias depois da lesão, os animais foram submetidos a transplante estereotáxico na região do hipocampo com MAPCs criopreservadas (descongeladas mesmo antes do transplante) derivadas ou de SD ratos (singénico, marcado com GFP, 200.000 células por animal) ou de ratos Fisher (alogénico, marcado com β -gal, 200.000 células por animal). Todos os animais foram tratados com imunossupressão diária (CSA, 1 mg/kg, i.p.) ao longo do período de sobrevivência. Nos dias 7 e 14 após transplantação, foi realizado o teste "*Elevated Body Swing Test*" (EBST) e o teste de Rotarod para revelar as funções motoras gerais e coordenadas e as funções neurológicas como descrito em Borlongan et al., JNeurosci., 15: 5372-5378 (1995). Os animais foram eutanizados para

análise imunohistoquímica das MAPCs enxertadas após os testes no dia 14. É representado na figura 1 um fluxograma da experiência. Não foi observada mortalidade nos animais que receberam transplantes de MAPC durante o decurso do estudo.

EXEMPLO 2A: Avaliação das capacidades locomotoras no dia 7 e 14 após injeção de MAPC em ratos com lesão HI

Os animais foram tratados como descrito no exemplo 1. No 7º dia após transplantação, os animais com lesão HI transplantados com MAPC apresentaram uma tendência para uma menor assimetria motora como determinado pelo EBST (64%-65% versus 75%) e mais tempo passado no "rotarod" (14,1-16,5 versus 18 segundos) em comparação com os animais com lesão infundidos com veículo. No 14º dia após transplantação, os animais transplantados com MAPC exibiram uma assimetria motora significativamente reduzida (66%-70% versus 87%) e mais tempo passado no "rotarod" (27,3-28,3 versus 21 segundos) do que os animais controle que receberam a infusão veículo. MAPCs singénicas e alogénicas transplantadas nos animais com lesão não diferem estatisticamente na sua melhoria comportamental em ambos os períodos teste. Os resultados estão representados graficamente na figura 2. Os resultados mostram os efeitos terapêuticos das MAPCs injetadas no modelo do rato com lesão HI em ambas as avaliações locomotoras e neurológicas.

EXEMPLO 2B: Análise histológica do enxerto de MAPC no dia 14 após a injeção de MAPC em cérebros de Rats com HI

Os animais foram tratados como descrito no exemplo 1. Foram detetadas as MAPCs enxertadas nos cérebros dos animais com lesão HI após sacrifício no 14º dia após transplantação através de análise histológica. Foram detetados enxertos

singénicos positivos para GFP sobretudo no local de transplante original do hipocampo CA3 e região adjacente CA2, a qual co-marcou com DAPI. Os enxertos alogénicos, detetados por coloração anti- β -gal e co-marcados com DAPI, exibiram um padrão similar de sobrevivência do enxerto em cérebros com lesão HI. A sobrevivência do enxerto foi de 0,96% no 14º dia (valor ANOVA F é 24,27, df = 2, 19 e $p < 0.0001$; post-hoc de Fisher é $p < 0.0001$). Os resultados mostram que ambas as MAPCs alogénicas e singénicas enxertam no local de injeção e persistem pelo menos duas semanas após injeção intracerebral direta em animais no modelo do rato com lesão HI.

EXEMPLO 3: MAPCs enxertadas protegem neurónios endógenos

Os animais foram tratados como descrito no exemplo 1. Foi realizada análise histológica muito como descrito no exemplo 2B, mas foram coradas com Nissl seções do cérebro alternadas para determinar o nível de viabilidade neuronal endógena. Houve uma diminuição significativa da morte neuronal endógena em animais que foram injetados com MAPCs singénicas ou alogénicas, em comparação com animais injetados com veículo como controlo. Os resultados estão representados graficamente na figura 3. Os resultados mostram que a administração de MAPC protege os neurónios endógenos da lesão hipóxica-isquémica, resultando num aumento da viabilidade neuronal.

EXEMPLO 4: Co-localização de MAPCs enxertadas e neurónios mostrado por análise dos marcadores

Os animais foram tratados como descrito no exemplo 1. Seções do cérebro geradas de ratos tratados com MAPC foram co-coradas para os marcadores de MAPC descritos anteriormente (GFP para MAPCs singénicas ou β -gal para

MAPCs alogénicas) e simultaneamente para MAP2, um marcador bem conhecido de neurónios. Foram descobertas algumas células que expressavam ambos os respetivos marcadores para MAPC e marcadores neuronais em ambos os animais enxertados singénicos e alogénicos, mostrando que algumas MAPCs se diferenciaram em neurónios; embora seja possível que algumas células duplamente coradas sejam o resultado raro da fusão de uma células MAPC enxertada com uma célula endógena neuronal. Os resultados mostram diferenciação neuronal fenotípica precoce de MAPCs no 14º dia após administração em animais do modelo do rato com lesão HI.

EXEMPLO 5: MAPCs são terapeuticamente benéficas no modelo do rato neonatal com lesão HI sem imunossupressão quando administradas por injeção estereotáxica ou infusão I.V.

Crias de ratos Sprague Dawley (SD) de sete dias de idade (n=7 por grupo teste) foram sujeitas a lesão HI por laqueação unilateral da carótida seguido de 8% hipóxia, como descrito no exemplo 1 anterior e na referência citada aqui. Sete dias após lesão HI os animais foram submetidos a transplantação estereotáxica na região do hipocampo com MAPCs criopreservadas (descongeladas mesmo antes da transplantação) derivadas de ratos Fisher (alogénicos, marcado com β -gal, 200.000 células por animal). Foram realizados testes comportamentais nos dias 7 e 14 após transplantação utilizando o teste EBST e o Rotarod para revelar funções motoras gerais e coordenadas e funções neurológicas. No 14º dia, os animais tratados com MAPC mostraram melhoria estatisticamente significativa em ambos os grupos de administração intracranial e IV em ambos os testes EBST e Rotarod, em comparação com o grupo controlo, o qual recebeu apenas PBS ($p < 0,05$ para ambos os testes).

EXEMPLO 6: Tratamento de acidente vascular cerebral com MAPCs xenogénicas (humanas) no modelo do roedor com acidente vascular cerebral por oclusão MCA

Vinte e oito ratos SD adultos foram submetidos a cirurgia para oclusão da artéria cerebral média (MCA) para induzir um acidente vascular cerebral cirúrgico nos animais. Sete dias após a indução de acidente vascular cerebral, os animais foram separados em quatro coortes de sete animais cada um. Cada coorte recebeu uma administração intracerebral direta de um dos seguintes: (1) 3 µl injeção de PBS (controle), (2) 3 µl injeção de PBS contendo 100.000 MAPCs humanas, (3) 3 µl injeção de PBS contendo 200.000 MAPCs humanas, e (4) 3 µl injeção de PBS contendo 400.000 MAPCs humanas. Os animais foram testados como descrito nos exemplos a seguir, e sacrificados no dia 21.

EXEMPLO 7: Benefício terapêutico da administração de MAPC no modelo de acidente vascular cerebral demonstrado por testes locomotores e neurológicos

Os animais foram tratados como descrito no exemplo 6. No dia 7 e 14 após transplantação, cada animal foi submetido ao teste EBST e Bederson para determinar a função locomotora e neurológica, como descrito anteriormente. Foi observada uma melhoria estatisticamente significativo na propensão de balançar no EBST em animais que receberam 200.000 ou 400.000 células em comparação com o controle no 7º dia após transplantação. No 14º dia, todas as três coortes de animais a receber injeções de MAPC humanas mostraram melhoria significativa em comparação com o grupo controle. Os resultados estão representados no gráfico superior e inferior do lado esquerdo da figura 4.

Simultaneamente mas separado de EBST, cada rato foi sujeito ao painel Bederson de quatro tarefas para avaliar a função neurológica nos dias 14 e 21 após o acidente vascular por oclusão da MCA. Os quatros testes são pontuados de 0 (nenhum défice neurológico observável) a 3 (grave défice neurológico) para cada um dos quatro testes. É feita então a média das quatro pontuações para proporcionar uma avaliação global da função neurológica. No 7º dia após transplantação de MAPC, os animais que receberam 200.000 ou 400.000 células mostraram uma melhoria estatisticamente significativa da função neurológica em comparação com os animais controlo. No 14º dia, todas as 3 coortes a receber injeções de MAPC humanas demonstraram melhoria significativa em comparação com o grupo controlo. Os resultados estão representados no gráfico superior e inferior do lado direito da figura 4.

Os resultados mostram uma melhoria estatisticamente significativa, dependente da dose, dos animais no primeiro ponto de ensaio (7 dias após injeção) em ambos os testes locomotores e neurológicos nos animais tratados com 200.000 ou 400.000 MAPCs. (Os animais tratados com 100.000 MAPCs não apresentaram melhoria estatisticamente significativa relativamente aos animais tratados apenas com o veículo como controlo.) Os resultados demonstram que a administração de MAPCs xenogénicas através de injeção intracerebral direta no cérebro do rato com acidente vascular cerebral provoca melhoria estatisticamente significativa em ambos os testes de benefício locomotor e neurológico quando comparado com os animais tratados apenas com veículo pelo menos tão cedo quanto uma semana após a injeção e persistindo por pelo menos duas semanas após a injeção.

EXEMPLO 8: Enxerto de MAPC em cérebros no modelo do rato com acidente vascular cerebral HI

Os ratos foram tratados como descrito no exemplo 6 anterior. Após o último teste comportamental no 14º dia após transplantação de MAPC, os animais foram sacrificados e os cérebros foram retirados. Seções semi-finas de tecido embebido em parafina foram coradas com DAPI para visualizar todos os núcleos celulares e com anticorpos policlonais de rato anti-HuNu (núcleos humanos), seguido de anticorpos monoclonais de cabra anti-rato conjugados com FITC para corar MAPCs humanas enxertadas. As MAPCs foram encontradas no córtex (CTX), na zona sub-ventricular (SVZ), e corpo estriado (STR). Os resultados mostram que as MAPCs humanas sobrevivem e enxertam após injeção intracerebral em ratos que apresentaram benefícios terapêuticos significativos da administração MAPC. A distribuição das células mostra que as MAPCs migram para regiões secundárias do cérebro e enxertam aí também assim como no local primário, onde as células foram injetadas. O mesmo padrão de sobrevivência e migração foi visto para injeções de 100.000 e 200.000 MAPCs. Não houve imunoreatividade HuNu detetável nos cérebros dos animais controle com acidente vascular cerebral que foram injetados apenas com o veículo. As percentagens de sobrevivência do enxerto foram 0,55%, 0,7%, e 0,51 % no 14º dia após o acidente vascular cerebral para 100.000, 200.000, e 400.000 doses de transplantação de MAPC, respetivamente. Os resultados mostram claramente que as MAPCs sobrevivem e enxertam nos cérebros do modelo de acidente vascular cerebral não apenas no local das injeções, mas que elas também migram para, e enxertam em locais secundários afastados do local da injeção. Em suma, até pelo menos duas semanas após a injeção intracerebral direta, MAPCs xenogénicas humanas estão presentes no local da lesão e da injeção (o corpo estriado), e em locais

secundários nos cérebros injetados, incluindo o córtex e a zona sub-ventricular.

EXEMPLO 9: Tratamento de acidente vascular cerebral isquêmico num modelo cirúrgico do rato com MAPCs alogénicas (ratos). Com MAPCs xenogénicas (humanas). Ambas com e sem tratamento imunossupressor concomitante

Trinta e cinco ratos SD foram sujeitos a cirurgia de laqueação da artéria cerebral média (MCA) para induzir um acidente vascular cerebral cirúrgico nos animais. Sete dias depois da indução do acidente vascular cerebral, os animais foram separados em cinco coortes de sete animais cada. Cada coorte recebeu administração intracerebral direta de um dos seguintes: (1) 3 µl injeção de PBS contendo 400.000 MAPCs de rato sem nenhuma imunossupressão; (2) 3 µl injeção de PBS contendo 400.000 MAPCs de rato com tratamento imunossupressor (CSA, 1 mg/kg, i.p.); (3) 3 µl injeção de PBS contendo 400.000 MAPCs humanas sem nenhuma imunossupressão; (4) 3 µl injeção de PBS contendo 400.000 MAPCs humanas com tratamento imunossupressor (CSA, 1 mg/kg, i.p.), e (5) 3 µl injeção de PBS contendo 400.000 MAPCs humanas irradiadas, não viáveis com tratamento imunossupressor (CSA, 1 mg/kg, i.p.).

EXEMPLO 10: Avaliação comportamental e neurológica do tratamento de acidente vascular cerebral isquêmico num modelo cirúrgico do rato com MAPCs alogénicas (rato), com MAPCS xenogénicas (humanas), ambas com e sem tratamento imunossupressor concomitante

Os animais foram tratados como descrito no exemplo 9. No 14º dia após transplantação, e cada 14 dias depois disso durante 8 semanas, cada animal foi submetido a teste EBST e Bederson para determinar a função locomotora e neurológica.

A administração de MAPCs xenogênicas e alogênicas resultaram ambas em melhorias estatisticamente significativas e sustentadas em ambas as avaliações EBST e Bederson, com ou sem tratamento imunossupressor. Os resultados mostram que MAPCs transplantadas 7 dias após a lesão isquêmica proporcionam benefícios terapêuticos sustentados a longo prazo (8 semanas) estatisticamente significativos nas funções comportamentais e neurológicas. Os resultados além disso mostram que não é necessário imunossupressão para os efeitos terapêuticos demonstrados. Os resultados estão representados graficamente nas figuras 5 e 6.

EXEMPLO 11: Tratamento de acidente vascular cerebral isquêmico num modelo cirúrgico do rato com MAPCs xenogênicas (humanas) administradas por injeção ou por infusão I.V., com ou sem imunossupressão

Quarenta e dois ratos SD foram submetidos a cirurgia de laqueação da artéria cerebral média (MCA) para induzir um acidente vascular cerebral cirúrgico nos animais. Sete dias depois da indução do acidente vascular cerebral, os animais foram separados em seis coortes de sete animais cada. Cada coorte recebeu a administração intravenosa de um dos seguintes: (1) 400.000 MAPCs humanas com tratamento imunossupressor (CSA, 1 mg/kg, i.p.); (2) 400.000 MAPCs humanas sem nenhuma imunossupressão; (3) 1.000.000 MAPCs humanas com tratamento imunossupressor (CSA, 1 mg/kg, i.p.); (4) 1.000.000 MAPCs humanas sem nenhum tratamento imunossupressor; (5) 1.000.000 MAPCs humanas irradiadas, não viáveis, com tratamento imunossupressor (CSA, 1 mg/kg, i.p.), e (6) 1.000.000 MAPCs humanas irradiadas, não viáveis, sem nenhum tratamento imunossupressor.

EXEMPLO 12: Tratamento de acidente vascular cerebral isquêmico num modelo cirúrgico de rato com MAPCs xenogênicas (humanas) administradas através de injeção ou infusão I.V., com e sem imunossupressão - avaliações comportamentais e neurológicas

Os animais foram tratados como descrito no exemplo 11. No 14º dia após transplantação celular, e cada 14 dias depois disso durante 8 semanas, foi avaliada a função locomotora e neurológica de cada animal através do teste EBST e Bederson, respectivamente.

Os animais foram sacrificados após os testes no 56º dia após transplantação.

Os resultados mostram um efeito terapêutico significativo, dependente da dose na função locomotora. Os animais infundidos com 1.000.000 MAPCs viáveis mostraram melhoria significativa relativamente ao grupo controle correspondente tratado com MAPCs irradiadas. O mesmo resultado foi obtido com e sem imunossupressão. Não houve melhoria significativa nos animais infundidos com 400.000 MAPCs viáveis relativamente ao grupo controle correspondente tratado com MAPCs irradiadas. O mesmo resultado foi obtido com e sem imunossupressão.

Os resultados também mostram um efeito significativo dependente da dose na função neurológica. Os animais tratados com ambas 400.000 e 1.000.000 MAPCs viáveis mostraram melhorias significativas relativamente aos grupos correspondentes tratados com MAPCs irradiadas. Houve uma tendência para o declínio da recuperação ao longo dos 56 dias da experiência nos animais tratados com 400.000 células mas não naqueles tratados com 1.000.000 células. Os mesmos resultados foram obtidos com e sem imunossupressão.

Em suma, os animais tratados com 1.000.000 MAPCs viáveis mostraram uma melhoria estatisticamente significativa, sustentada em ambas as funções locomotoras e neurológicas ao longo do decurso total de 8 semanas da experiência. O efeito terapêutico, além disso, não requiere imunossupressão. Os resultados são os mesmos com e sem CSA.

Os resultados estão representados graficamente nas figuras 7 e 8.

EXEMPLO 13: Efeito do momento do tratamento de acidente vascular cerebral isquémico num modelo cirúrgico do rato com MAPCs xenogénicas (Humanas) administradas por infusão I.V.

Vinte e oito ratos SD foram submetidos a cirurgia de laqueação da artéria cerebral média MCA para induzir um acidente vascular cerebral cirúrgico nos animais. Os animais foram separados em quatro coortes de sete animais cada. Cada coorte recebeu 1.000.000 MAPCs xenogénicas (humanas) por infusão intravenosa, sem imunossupressão. Todos os grupos foram tratados da mesma forma, exceto que as MAPCs foram administradas em diferentes momentos após indução do acidente vascular cerebral. As MAPCs foram administradas aos grupos no seguinte número de dias após indução: (1) um dia, (2) dois dias, e (3) sete dias. Para além disso o grupo (4) recebeu 1.000.000 MAPCs irradiadas, não viáveis, no 7º após indução.

Não foi observada nenhuma mortalidade nos animais a receber MAPCs durante o estudo.

EXEMPLO 14: Efeito do momento do tratamento de acidente vascular cerebral isquémico num modelo cirúrgico do rato

com MAPCs xenogénicas (humanas) administradas por infusão I.V. - função locomotora e neurológica

Os animais foram tratados como descrito no exemplo 12. No 7º dia após transplantação celular, e cada 7 dias depois disso durante 8 semanas, foi avaliada a função locomotora e neurológica de cada animal através do teste EBST e Bederson, respetivamente.

Os resultados de todos os três grupos de animais tratados com MAPCs viáveis mostram uma melhoria estatisticamente significativa, sustentada, em ambas as funções locomotoras e neurológicas em comparação com o grupo controlo tratado com MAPCs irradiadas (grupo 4). Não houve diferenças estatísticas entre os resultados para a função locomotora obtidos dos três grupos tratados com MAPCs viáveis. O mesmo foi verdade para os resultados dos três grupos para a função neurológica.

Os resultados demonstram que as MAPCs proporcionam um benefício terapêutico em ambas as funções locomotoras e neurológicas quando administradas IV no primeiro até ao sétimo dia a seguir à lesão cerebral isquémica.

Os resultados estão representados graficamente nas figuras 9 e 10.

EXEMPLO 15: Efeito do momento do tratamento de acidente vascular cerebral isquémico num modelo cirúrgico do rato com MAPCs xenogénicas (humanas) administradas por infusão I.V. - enxerto

Os animais foram tratados como descrito no exemplo 12. Os animais foram sacrificados a seguir ao teste comportamental final no 56º dia para cada grupo. Os cérebros foram

retirados dos animais sacrificados. Foram preparadas seções semi-finas de tecido embebido em parafina a partir dos cérebros. As seções foram coradas com DAPI para visualizar todos os núcleos celulares e com anticorpos policlonais de rato anti-HuNu (núcleos humanos), seguido de anticorpos monoclonais de cabra anti-rato conjugados com FITC para corar MAPCs humanas enxertadas. Ambas as células coradas por DAPI e as células coradas com FITC foram contadas. O número total de células enxertadas foi determinado pelo número de células coradas com FITC. A percentagem de MAPCs injetadas que enxertaram foi calculado pelo rácio do número total de células enxertadas para o número total de células infundidas em cada animal.

Os resultados mostram um pouco menos células enxertadas nos primeiros tempos de administração após lesão. Os animais administrados com MAPCs um dia após a lesão tiveram uma média de 0,75% enxertos. Aqueles administrados com MAPCs 2 dias após a lesão tiveram uma média de 1,1% células enxertadas. Os animais administrados com MAPCs 7 dias após a lesão tiveram uma média de 1,27% células enxertadas viáveis. A tendência não é estatisticamente significativa; mas, sugere que o meio inflamatório da lesão isquêmica imediatamente após um acidente vascular cerebral possa ser menos favorável para o enxerto e sobrevivência das MAPCs a longo prazo do que o meio presente apenas poucos dias depois.

EXEMPLO 16: Efeito do momento do tratamento de acidente vascular cerebral isquémico num modelo cirúrgico do rato com MAPCs xenogénicas (humanas) administradas por infusão I.V. - proteção neuronal

Os animais foram tratados como descrito no exemplo 12. Foram preparadas seções dos cérebros como descrito no

exemplo 14. Seções alternadas (àquelas utilizadas no exemplo 14) foram coradas com Nissl para determinar a viabilidade neuronal endógena. Os resultados mostram uma diminuição estatisticamente significativa da morte neuronal endógena com a administração de MAPC. O efeito protetor das MAPCs da viabilidade neuronal endógena aumenta à medida que o tempo diminui entre a indução do acidente vascular cerebral e a administração de MAPC. Havia mais neurónios viáveis nos animais a receber MAPCs no dia 1 após a indução do acidente vascular cerebral do que naqueles a receber MAPCs no dia 2 após a indução do acidente vascular cerebral, e a diferença era estatisticamente significativa. Similarmente, havia mais neurónios viáveis nos animais a receber MAPCs no dia 2 após a indução de acidente vascular cerebral do que naqueles a receber MAPCs no dia 7 após a indução de acidente vascular cerebral, e esta diferença também era estatisticamente significativa. Os resultados indicam que quanto mais cedo forem administradas MAPCs após um evento isquémico, tanto maior é o efeito protetor da viabilidade neuronal endógena.

Os resultados estão representados graficamente na figura 11.

REIVINDICAÇÕES

1. Células para utilização no tratamento de lesão cerebral num sujeito que tenha a probabilidade de sofrer, que sofra ou que tenha sofrido uma lesão cerebral, em que as células não são células estaminais embrionárias, células germinativas embrionárias, nem células germinativas, em que as células expressam oct3/4 e telomerase e são alogénicas ou xenogénicas para o sujeito, e podem diferenciar-se em pelo menos um tipo de células de cada de pelo menos duas das linhagens embrionárias endodérmica, ectodérmica, e mesodérmica, e são administradas por uma via efetiva e numa quantidade efetiva para tratar a dita lesão cerebral, em que o dito sujeito não é tratado com uma terapia imunossupressora adjuvantemente ao tratamento com as ditas células.
2. A utilização de células para a produção de um medicamento para o tratamento de lesão cerebral num sujeito que tenha a probabilidade de sofrer, que sofra ou que tenha sofrido uma lesão cerebral, em que as células não são células estaminais embrionárias, células germinativas embrionárias, nem células germinativas, em que as células expressam oct3/4 e telomerase e são alogénicas ou xenogénicas para o sujeito, e podem diferenciar-se em pelo menos um tipo de células de cada de pelo menos duas das linhagens embrionárias endodérmica, ectodérmica, e mesodérmica, e são administradas por uma via efetiva e numa quantidade efetiva para tratar a dita lesão cerebral, em que o dito sujeito não é tratado com uma terapia imunossupressora adjuvantemente ao tratamento com as ditas células.

3. Células para utilização ou utilização de qualquer uma das reivindicações 1 a 2, em que a lesão cerebral é causada por hipóxia e/ou por uma oclusão ou um bloqueio do fornecimento sanguíneo.
4. Células para utilização ou utilização de qualquer uma das reivindicações 1 a 2, em que a lesão cerebral é lesão cerebral hipóxica-isquêmica, enfarte cortical e/ou acidente vascular cerebral.
5. Células para utilização ou utilização de qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que as ditas células se podem diferenciar em pelo menos um tipo de células de cada das linhagens embrionárias endodérmica, ectodérmica, e mesodérmica.
6. Células para utilização ou utilização de qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que as ditas células são administradas ao dito sujeito numa ou mais doses compreendendo 10^5 a 10^8 das ditas células por quilograma da massa do sujeito incluindo uma ou mais doses compreendendo 10^6 a 5×10^7 das ditas células por quilograma da massa do sujeito.
7. Células para utilização ou utilização de qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que além disso é administrado qualquer combinação de um ou mais de cada um dos seguintes ao dito sujeito: um agente antibiótico, um agente antifúngico e/ou um agente antiviral.
8. Células para utilização ou utilização de qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que as ditas células são

administradas numa formulação compreendendo um ou mais agentes ativos farmacêuticos.

9. Células para utilização ou utilização de acordo com a reivindicação 8, em que a dita formulação além disso compreende qualquer combinação de um ou mais de: um agente antibiótico, um agente antifúngico e/ou um agente antiviral.
10. Células para utilização ou utilização de qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que as ditas células são administradas ao sujeito por uma via parentérica, por infusão intravenosa e/ou por injeção estereotáxica.

FIGURA 1

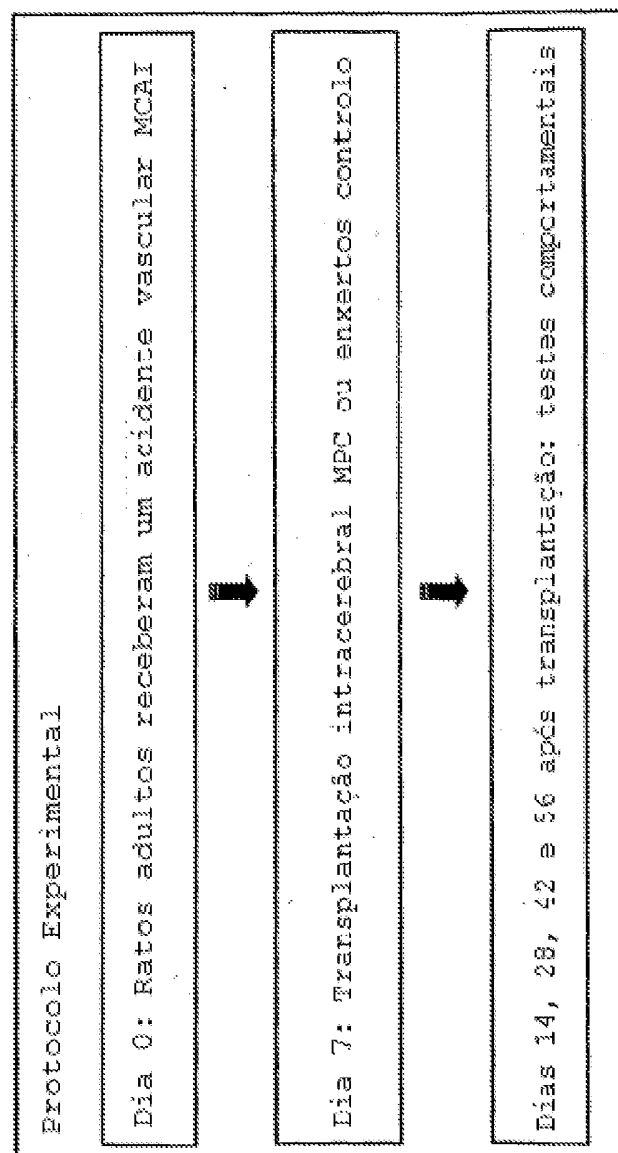


FIGURA 2

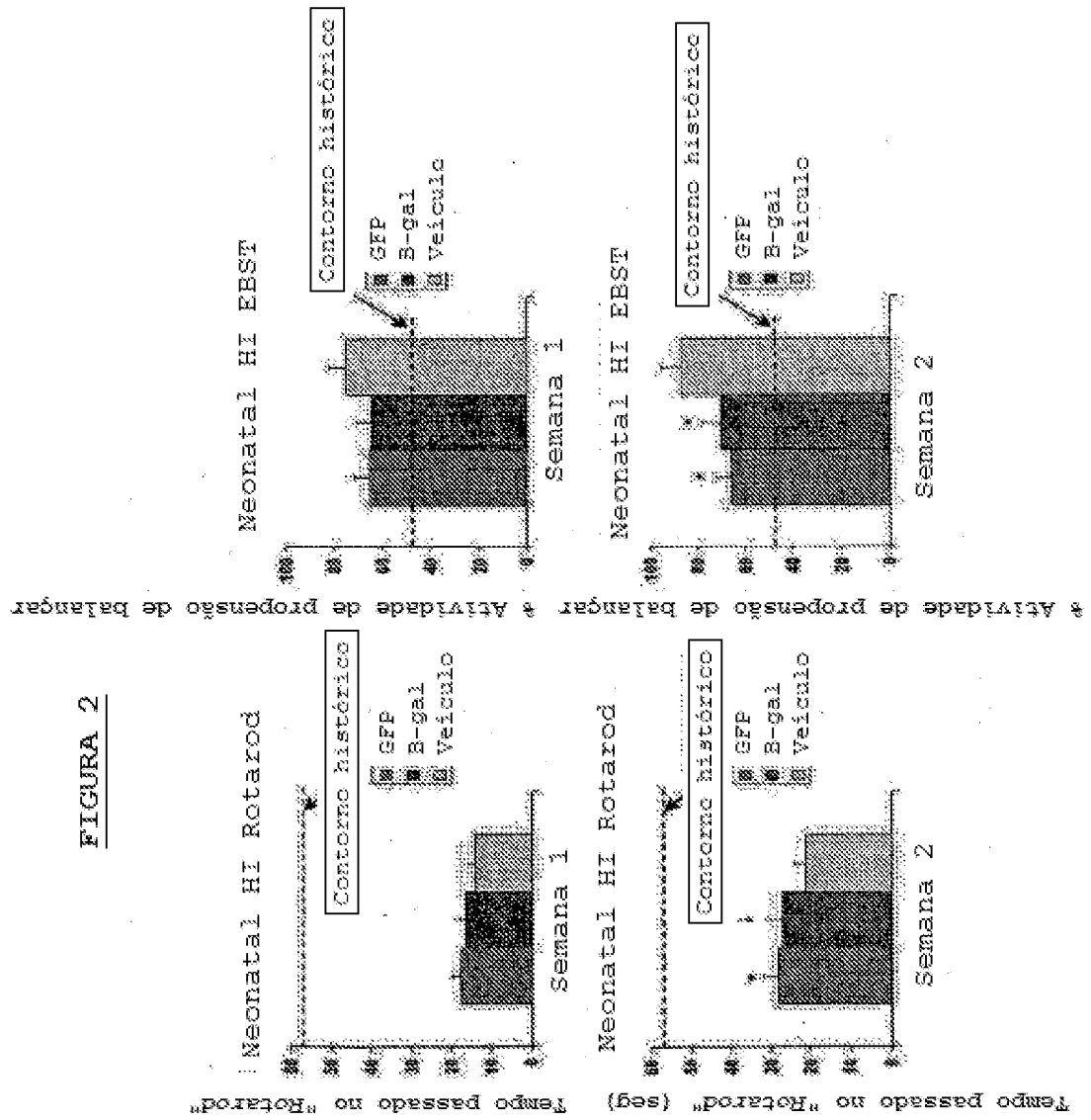


FIGURA 3

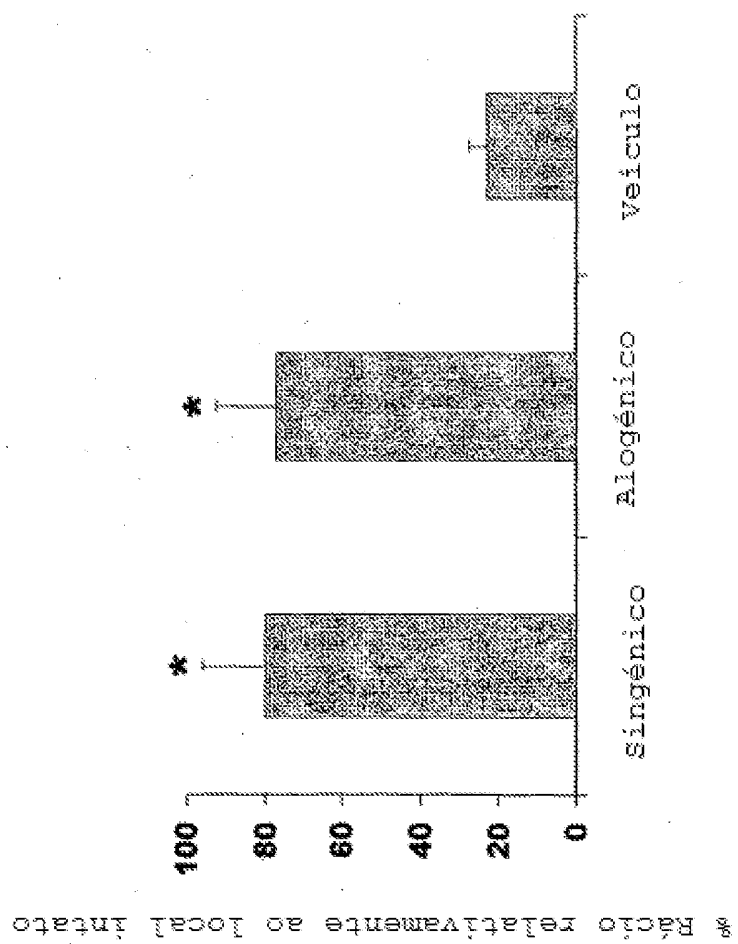


FIGURA 4

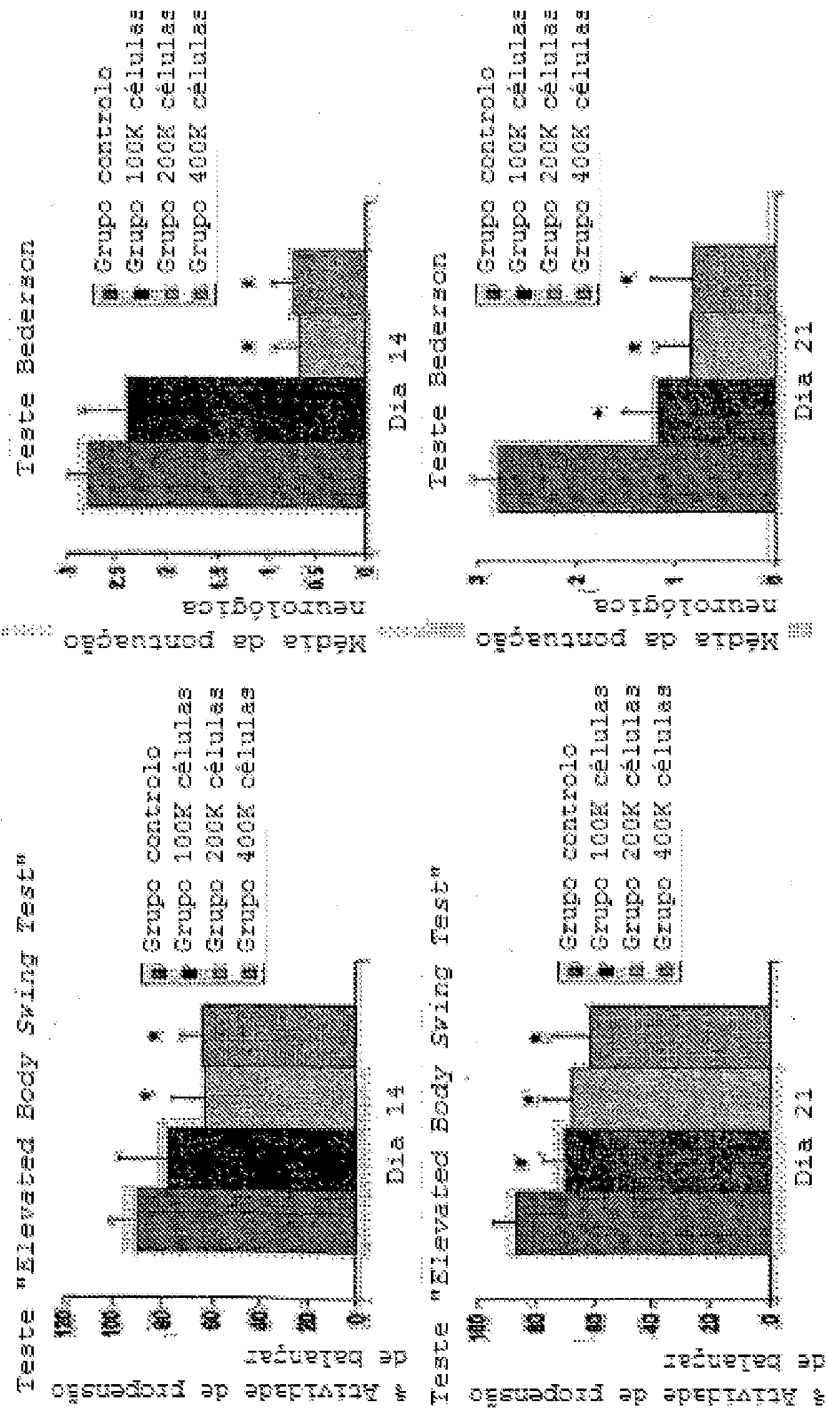


FIGURA 5

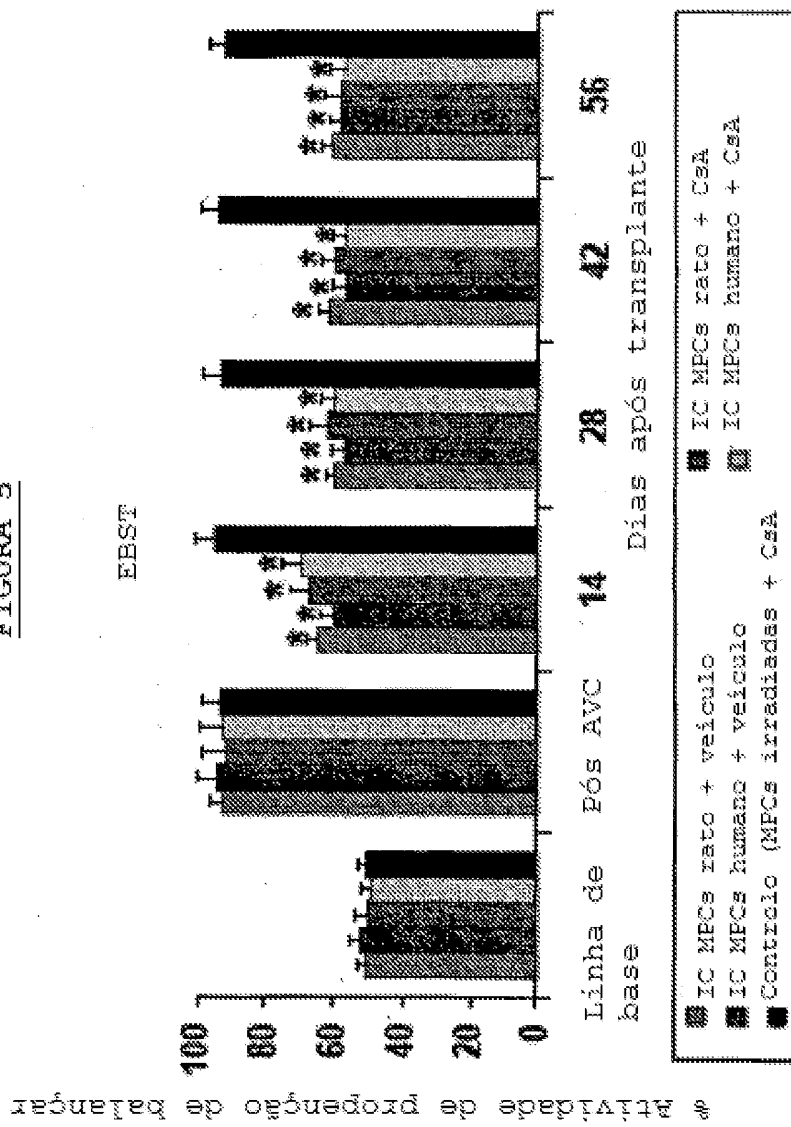
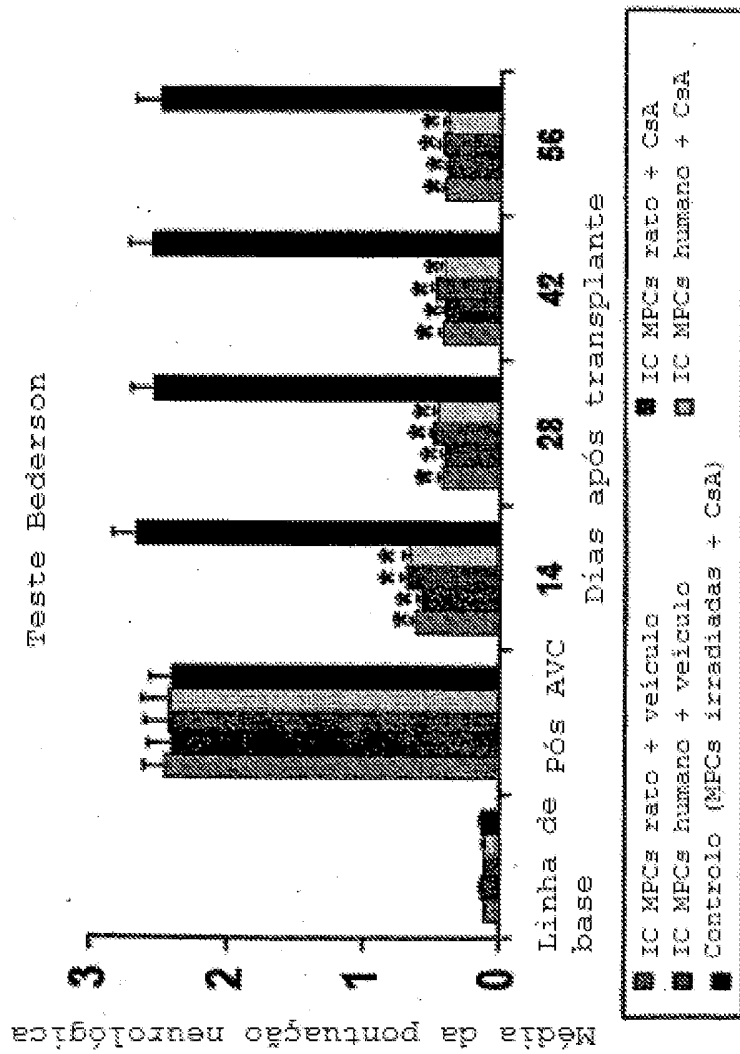


FIGURA 6



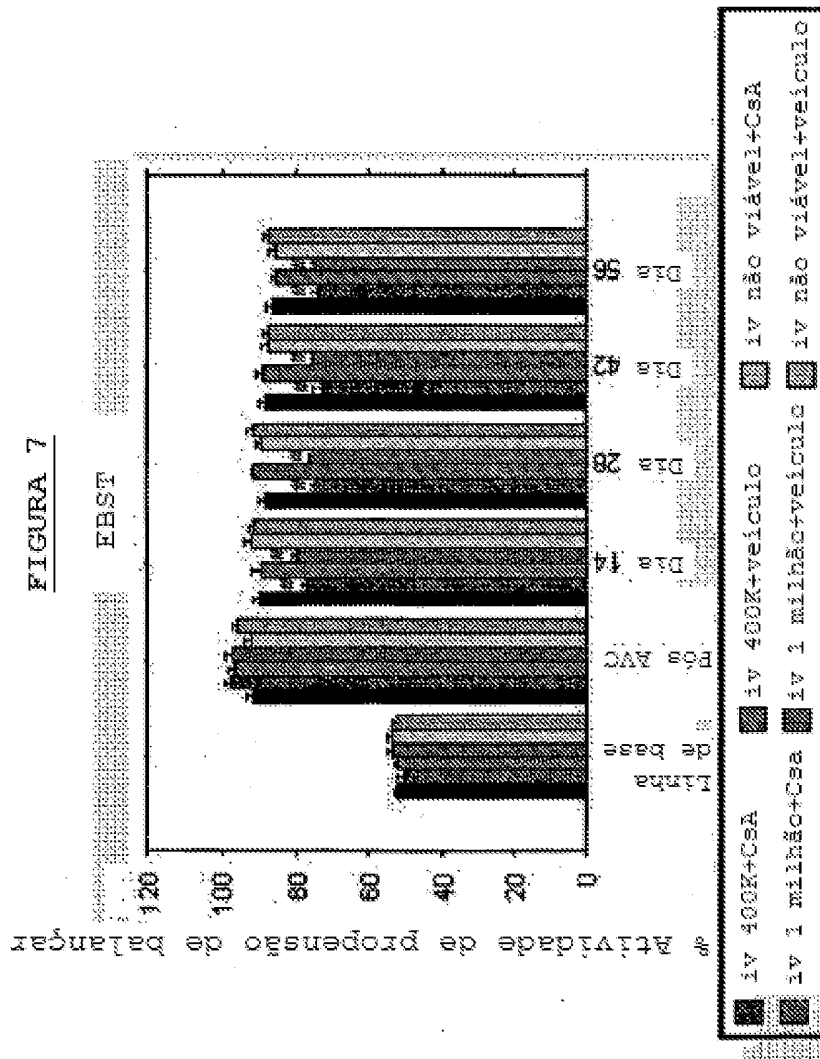


FIGURA 8

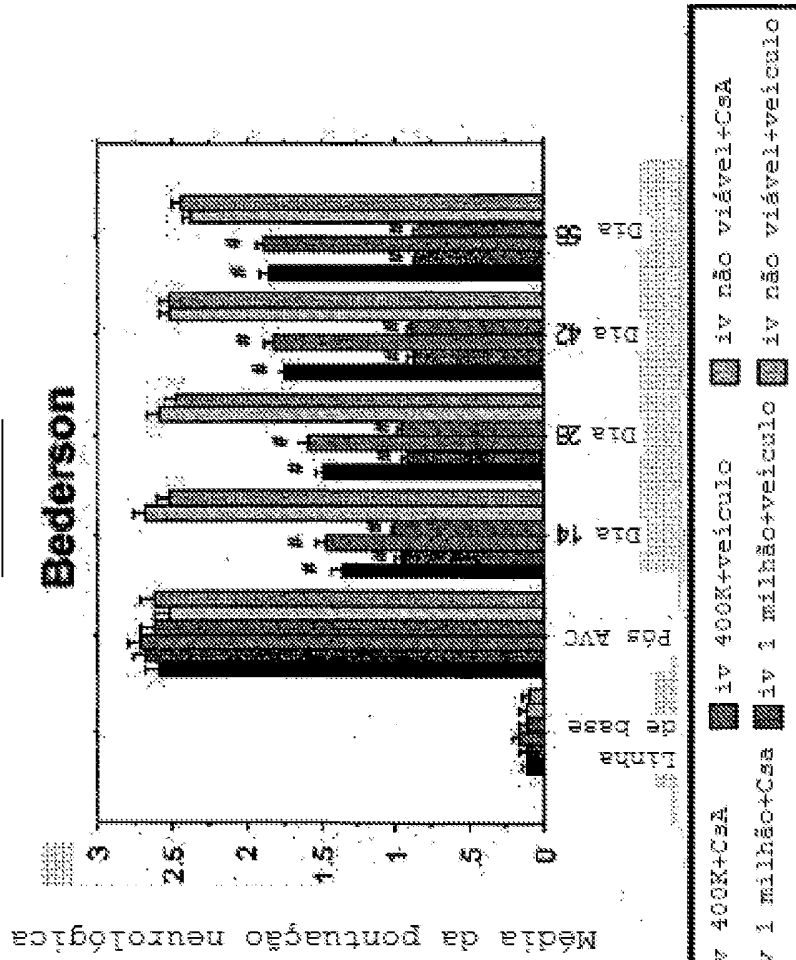
Bederson

FIGURA 9

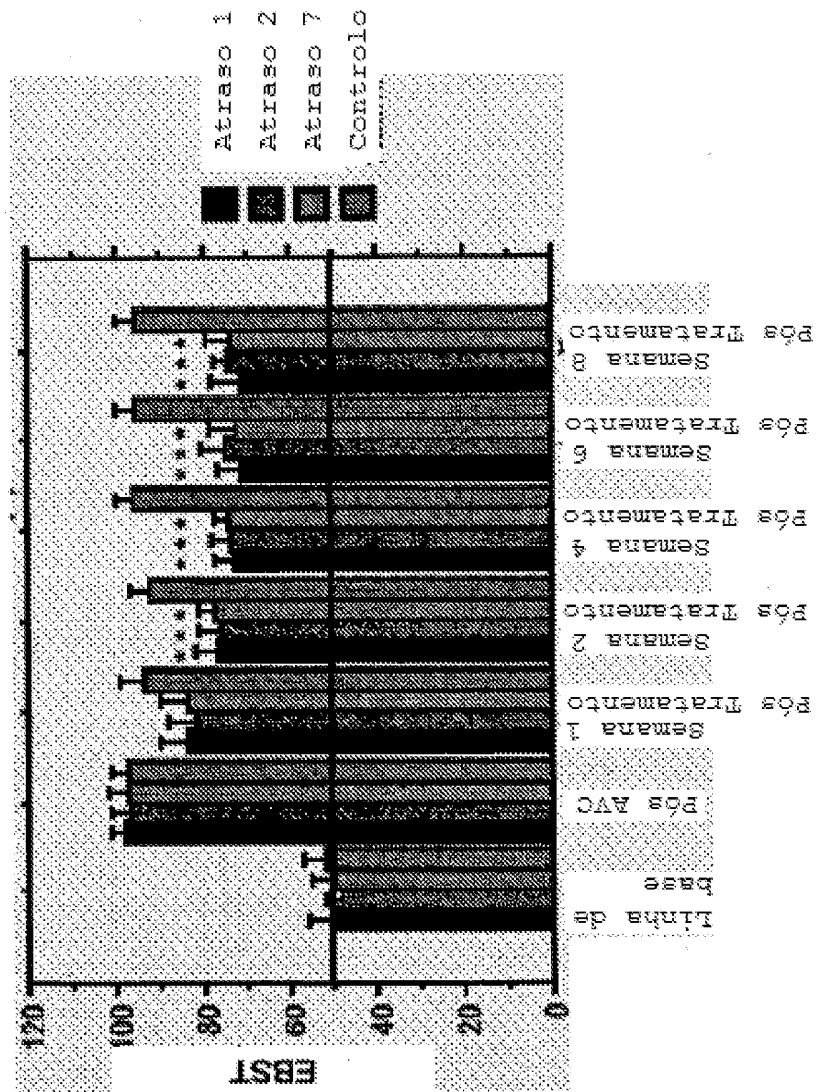


FIGURA 10

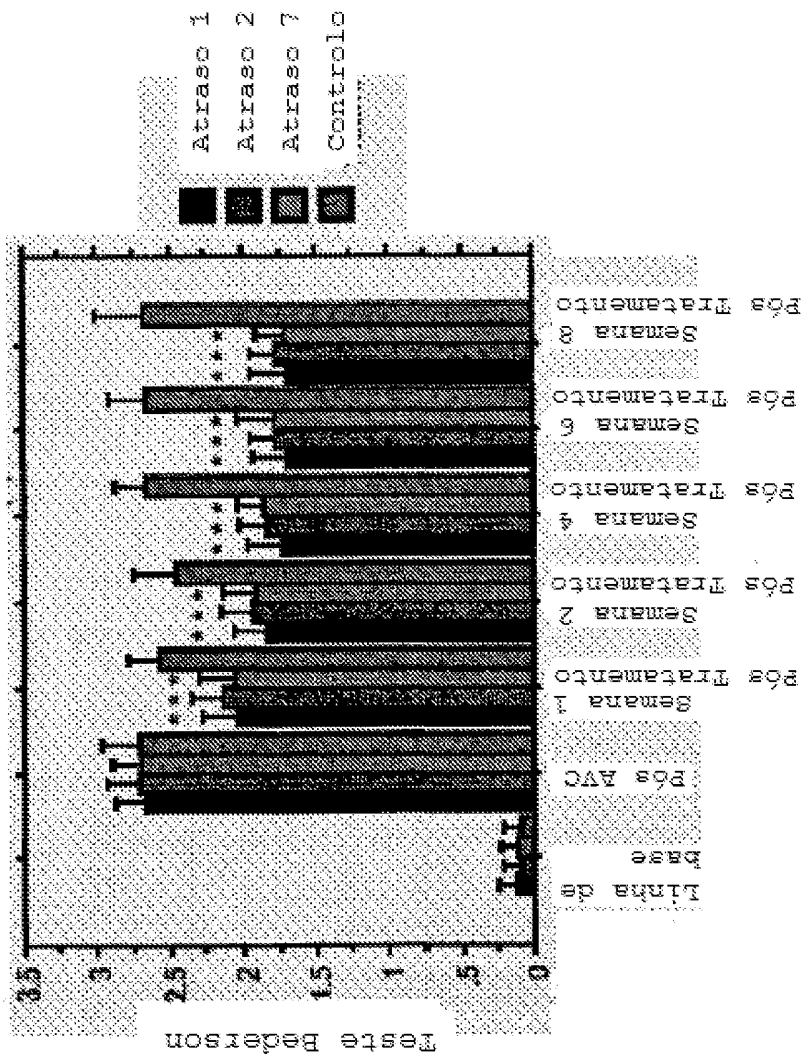


FIGURA 11