

(11) Número de Publicação: **PT 2626417 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 5/775 (2015.01) **A61K 35/12** (2015.01)
C12N 5/73 (2015.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2007.03.22	(73) Titular(es): PLURISTEM LTD.	
(30) Prioridade(s): 2006.03.23 US 784769 P 2006.09.26 US 847088 P	MATAM BUILDING 20 31905 HAIFA	IL
(43) Data de publicação do pedido: 2013.08.14	(72) Inventor(es): SHAI MERETZKI	IL
(45) Data e BPI da concessão: 2015.09.02 224/2015	ZAMI ABERMAN	IL
	ORA BURGER	IL
	(74) Mandatário: MANUEL BASTOS MONIZ PEREIRA	
	RUA DOS BACALHOEIRO, 4 1100-070 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **MÉTODOS PARA EXPANSÃO CELULAR E USOS DE CÉLULAS E DE MEIOS CONDICIONADOS PRODUZIDOS ATRAVÉS DELES PARA TERAPIA**

(57) Resumo:

UM MÉTODO DE EXPANSÃO CELULAR É FORNECIDO. O MÉTODO COMPREENDE CULTIVAR AS CÉLULAS ADERENTES DA PLACENTA OU DO TECIDO ADIPOSEO SOB CONDIÇÕES DE CULTURA TRIDIMENSIONAIS, QUE SUPORTAM A EXPANSÃO DAS CÉLULAS.

RESUMO

MÉTODOS PARA EXPANSÃO CELULAR E USOS DE CÉLULAS E DE MEIOS CONDICIONADOS PRODUZIDOS ATRAVÉS DELES PARA TERAPIA

Um método de expansão celular é fornecido. O método compreende cultivar as células aderentes da placenta ou do tecido adiposo sob condições de cultura tridimensionais, que suportam a expansão das células.

DESCRIÇÃO

MÉTODOS PARA EXPANSÃO CELULAR E USOS DE CÉLULAS E DE MEIOS CONDICIONADOS PRODUZIDOS ATRAVÉS DELES PARA TERAPIA

CAMPO E ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a métodos de expansão celular, populações de células produzidas através deles e usos das mesmas. Especificamente, a presente invenção refere-se a métodos de expansão de células aderentes de placenta e tecidos adiposos (ao longo de todo o PCT) e usos terapêuticos das mesmas, tais como para transplante de células-tronco hematopoiéticas.

No mundo médico em desenvolvimento, existe uma crescente necessidade de células-tronco adultas em grandes quantidades com a finalidade de realizar enxertos celulares e para engenharia de tecido. Além disso, a terapia com células-tronco adultas está em constante desenvolvimento para tratar e curar várias condições, tais como doenças hematopoiéticas, doenças cardíacas, doença de Parkinson, mal de Alzheimer, derrame, queimaduras, distrofia muscular, doenças autoimunes, diabetes e artrite.

As células-tronco hematopoiéticas (HSC) são células precursoras que dão origem a todos os tipos de células do sangue tanto da linhagem mieloide como da linhagem linfoide. O enxerto e início da hematopoiese por HSCs dependem da capacidade de essas células aderirem e proliferarem dentro da BM do recetor.

É amplamente aceite que as células-tronco estão intimamente associadas in vivo a nichos distintos existentes na medula, os quais oferecem sinais moleculares que mediam

coletivamente sua diferenciação e auto-renovação, via contatos célula-célula ou interações de curto alcance. Esses nichos são parte do "microambiente indutivo hematopoiético" (HIM), composto de células da medula, i.e. macrófagos, fibroblastos, adipócitos e células endoteliais. As células da medula mantêm a integridade funcional do HIM oferecendo proteínas de matriz extracelular (ECM) e componentes de membrana basal que facilitam o contato célula-célula. Também fornecem várias citocinas solúveis ou residentes necessárias para a diferenciação e proliferação controladas de células hematopoiéticas.

As interações entre HSC e o estroma são necessárias para preservar a viabilidade das HSCs e evitar sua diferenciação. Depois do transplante de HSCs, as HSCs transplantadas devem aderir ao microambiente da medula óssea (BM) e alojar-se nos nichos apropriados antes de se proliferar e diferenciar. Durante o processo de adesão, as HSCs transplantadas deixam a corrente sanguínea e transmigram seguindo um gradiente de quimiocinas através da barreira de células endoteliais da BM para chegar aos nichos dedicados. As HSCs do doador devem então aderir aos nichos hematopoiéticos nos quais encontram um microambiente mais favorável à divisão de HSC e, onde podem ser estabelecidos contatos físicos e químicos em sequência contínua entre as HSCs e as células mesenquimais, a ECM e os fatores de crescimento secretados. Todos esses processos envolvem um conjunto complexo de moléculas, tais como citocinas, quimiocinas, hormônios, esteróides, proteínas de matriz extracelular, fatores de crescimento, proteínas de interação célula-a-célula, proteínas de adesão e proteínas de matriz.

O número total de células enxertadas nos nichos dedicados

da BM fundamenta o sucesso do transplante de HSCs. Para realizar o enxerto, as HSCs do doador que são transplantadas para a circulação sanguínea devem aderir à medula do recetor na qual geram focos funcionais de hematopoiese. O número desses focos é concluído como o produto do total de HSCs transfundidas multiplicado por sua eficiência de enxerto.

Um dos principais problemas envolvidos no transplante de HSC é a baixa taxa de sobrevivência dessas células no sistema aceitante. Está bem documentado que as HSCs transplantadas por via intravenosa são liberadas da circulação e visualizadas na BM dentro de alguns minutos após sua transfusão. Três a cinco horas após o transplante de HSCs, não são detetadas células do doador no sangue periférico dos recetores [Askenasy e outros 2002 Transplanted hematopoietic cells seed in clusters in recipient bone marrow in vivo. Stem Cells. 20:301-10]. A vasta maioria das células transplantadas é destruída logo após serem transfundidas. Conseqüentemente, a colonização da medula do recetor é de baixa eficiência e apenas 1-5% das células transfundidas são detetados na BM do recetor 2-3 dias pós-transplante [Kerre e outros 2001 2001 Both CD34+38+ and CD34+38- cells home specifically to the bone marrow of NOD/LtSZ scid/scid mice but show different kinetics in expansion. J Immunol. 167:3692-8; Jetmore et al 2002 2002 Homing efficiency, cell cycle kinetics, and survival of quiescent and cycling human CD34 (+) cells transplanted into conditioned NOD/SCID recipients. Blood. 99:1585-93].

Células Estromais Mesenquimais (MSCs) constituem uma população de células heterogêneas, capazes de se diferenciar em tipos diferentes de células mesenquimais

maduras. A diferenciação dessas células em células endoteliais reticulares, fibroblastos, adipócitos e células precursoras osteogênicas, dependem da influência de vários fatores bioativos.

O uso de MSCs para o suporte do- enxerto de HSC é conhecido na técnica. Várias publicações demonstraram alta eficiência no enxerto de HSC quando co- transplantadas com células-tronco mesenquimais (Gurevitch e outros 1999 1999 Transplantation of allogeneic or xenogeneic bone marrow within the donor stromal microenvironment. Transplantation. 68:1362-8; Fan et al 2001 2001 Successful allogeneic bone marrow transplantation (BMT) by injection of bone marrow cells via portal vein: stromal cells as BMT-facilitating cells. [Stem Cells. 19:144-50]. Também foi demonstrado que o co-transplante de células-tronco mesenquimais humanas em um modelo de enxerto humano-ovelha, resultou na melhora do enxerto de longo prazo de BM quimérica com HSC humana em animais [Almeida-Porada e outros 2000]. O co-transplante de células progenitoras estromais humanas em ovelha fetal pré-imune resulta no rápido aparecimento de células do doador humano na circulação e aumenta os níveis celulares na medula óssea em pontos posteriores no tempo após o transplante (Blood. 95:3620-7]. Foi descoberto que a injeção simultânea de HSC e de células-tronco mesenquimais acelerou a hematopoiese [Zhang e outros 2004. Stem Cells 22:1256-62]. Recentemente, essas descobertas foram estendidas para um modelo animal mais próximo - o macaco Rhesus. Quando HSC haploidênticas e células-tronco mesenquimais foram co-transplantadas, ficou demonstrado o enxerto facilitado de HSC [Liu e outros 2005 Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi. 26; 385-8]. O uso de células-tronco mesenquimais para promover o enxerto de HSC em seres humanos também foi recentemente relatado [Koc ON, J Clin

Oncol. 2000;18:307-316; Lazarus HM, Biol Blood Marrow Transplant. 2005 May; 11 (5):389-98].

Aparentemente a contribuição das MSCs para o enxerto hematopoiético reside na produção de citocinas de suporte de HSC que ajudam a mediar e equilibrar os potenciais de adesão, autorrenovação e comprometimento das HSCs transplantadas, na reconstrução do microambiente hematopoiético danificado, o que é necessário para a adesão e proliferação das HSCs e inibição das células T originadas no doador, as quais podem, causar a Doença Enxerto-Hospedeiro (GvHD), [Charbord P., e Moore, K., Ann. N.Y. Acad. Sci. 1044: 159-167 (2005); Patentes norte-americanas N°s 6.010.696; 6.555.374]. Por exemplo, em um estudo de Maitra [Maitra B, et al., Bone Marrow Transplant. 33 (6): 597-604. (2004)], verificou-se que as células-tronco mesenquimais humanas suportam as células-tronco hematopoiéticas do doador não relacionadas e a ativação de célula T suprimida em modelo com ratinhos NOD-SCID, demonstrando que as MSCs obtidas da medula óssea humana não relacionadas podem melhorar o resultado do transplante alogênico.

Um obstáculo importante ao uso de MSCs é a dificuldade de isolar grandes quantidades de populações dessas células que ocorrem normalmente, o que é tecnicamente difícil e dispendioso, devido, em parte, à quantidade limitada de células. A fonte mais óbvia de MSCs é a medula óssea, mas o importante desconforto envolvido na obtenção de aspirados da medula óssea e o risco da biópsia servem como inconvenientes para esses métodos. A crença amplamente difundida de que o embrião humano e feto constituem vida independente torna o embrião humano uma fonte problemática de células-tronco, agregando um aspecto religioso e ético às

dificuldades logísticas já existentes.

Recentemente, vêm sendo feitas tentativas de encontrar fontes alternativas para extração de células-tronco. Essas fontes alternativas são, por exemplo, o tecido adiposo, folículos capilares, testículos, mucosa olfativa humana, saco vitelino embrionário, placenta, pele adolescente e sangue (por exemplo, sangue do cordão umbilical e até mesmo sangue menstrual). Contudo, a extração de células-tronco das fontes alternativas em quantidades adequadas para fins terapêuticos e de pesquisa ainda é limitada e geralmente trabalhosa, envolvendo, por exemplo, extrair células ou tecidos de um indivíduo doador ou paciente, realizar a cultura e/ou propagação das células in vitro, dissecação, etc.

A placenta é considerada uma das fontes mais acessíveis de células-tronco que não envolve nenhum desconforto nem limitações éticas. Verificou-se que as MSCs obtidas da placenta possuem propriedades semelhantes às MSCs obtidas da BM. São plástico-aderentes, expressam marcadores de membrana CD105, CD73 e CD90 e não possuem a expressão de moléculas de superfície CD45, CD34, CD14, CD19 e H1A-DR. Contudo, diferentemente das MSCs oriundas da BM, as (PD)-MSCs oriundas da placenta tratadas com interferon- γ diminuíram muito minimamente a expressão H1A-DR. Além disso, as células PD-MSCs demonstram propriedades imunossupressoras que são melhoradas na presença de interferon- γ . (Chang CJ, Yen ML, Chen YC, Chien CC, Huang Hl, Bai CH, Yen BL. Placenta-derived Multipotent Cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon- γ . Stem Cells. 2006 Nov;24(11):2466-77.)

Além dos marcadores de MSC, as PD-MSCs demonstram marcadores de superfície ESC únicos de SSEA-4, TRA-1-61 e TRA-1-80 que sugerem que estas podem ser células muito primitivas. (Yen BL, Huang HL, Chien CC, Jui HY, Ko BS, Yao M, Shun CT, Yen ML, Lee MC, Chen YC. Isolation of multipotent cells from human term placenta. Stem Cells. 2005;23 (1) :3-9). Além disso, as PD-MSCs (origem fetal), mas não as MSCs oriundas da BM, são positivas para o antígeno G de leucócito humano intracelular (HLA). ? (Chang CJ, Yen ML, Chen YC, Chien CC, Huang HL, Bai CH, Yen BL. Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon- gamma. Stem Cells. 2006 Nov; 24 (11):2466-77.)

Estudos demonstraram que o potencial de expansão das PD-MSCs era significativamente maior do que o das MSCs adultas obtidas da BM (Yen BL., Huang HL, Chien CC, Jui HY, Ko BS, Yao M, Shun CT, Yen ML, Lee MC, Chen YC. Isolation of Multipotent cells from Human Term Placenta. Stem Cells. 2005;23(1):3-9; M.J.S. de Groot- Swings, Frans H.J. Claas, Willem E. Fibbe and Humphrey H.H. Pierternella S. In't Anker, Sicco A. Scherjon, Carin Kleijburg-van der Keur, Godelieve. Placenta Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human. Stem Cells, 2004;22; 1338-1345). Além disso, as células aderentes obtidas da placenta podem se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos. Como as MSCs obtidas da BM, descobriu-se que as MSCs obtidas da placenta suprimem a proliferação de linfócitos do sangue do cordão umbilical (UCB) sugerindo que o transplante combinado de HSC e (PD)-MSCs obtidas da placenta pode reduzir o potencial da doença enxerto-hospedeiro (GvHD) em recetores [Li CD e outros, Cell Res. Jul;15(7):539-47 (2005)] e pode melhorar o suporte

hematopoiético [Zhang Yi e outros, Chinese Medical Journal 117(6): 882-887 (2004)]. O uso da placenta como fonte de células epiteliais amnióticas é ensinado, por exemplo, em WO 00/73421, mas obter essas células ainda é trabalhoso e a produção de MSCs é muito pequena.

Uma outra maneira de resolver o problema da quantidade limitada de MSCs é a expansão ex- vivo dessas células usando diferentes condições de cultura [por exemplo, Patentes norte-americanas n.ºs. 6.326.198; 6.030.836; 6.555.374; 6.335.195; 6.338.942]. Contudo, o inconveniente desses métodos permanece no tempo gasto, procedimentos específicos de seleção e isolamento que exigem, tornando esses métodos caros e fastidiosos.

Verificou-se em vários estudos que a cultura tridimensional (3D) de células é mais eficiente em termos de produção [Ma T, e outros, Biotechnology Progress. Biotechnol Prog 15:715-24 (1999); Yubing Xie, Tissue Engineering 7(5): 585-598 (2001)]. O uso de procedimentos de cultura 3D que imitam o ambiente natural das MSCs é baseado na fertilização dessas células em um biorreator de perfusão contendo espumas poliáticas (Wendt, D. e outros, Biotechnol Bioeng 84: 205-214, (2003)], sustentáculos porosos tubulares de ácido poli-L-lático (PLLA) em um biorreator de perfusão de fluxo radial [Kitagawa e outros, Biotechnology and Bioengineering 93(5):947-954 (2006)] e um biorreator de fluxo constante para o desenvolvimento e expansão de células-tronco hematopoiéticas (Patente norte-americana N.º 6.911.201).

Uma estrutura tridimensional que fixa as células estromais foi sugerida na Patente norte-americana N.º 6.022.743 e esponja de colágeno foi sugerida como matriz 3D em

Hosseinkhani, H e outros [Tissue Engineering 11(9-10); 1476-1488 (2005)]. Contudo, o uso de MSCs desenvolvidas nessas condições para suportar o enxerto in vivo de HSCs depois do transplante de HSC, nunca foi sugerido em nenhum desses estudos. Também, foi necessária a otimização demorada de várias condições, por exemplo, condições de perfusão, ou várias técnicas de isolamento para tipos específicos de célula.

Foi sugerido o uso de uma placenta pós-parto perfundida como reator 3D para a realização da cultura de MSCs na Patente norte-americana N° 7045148 e nos Pedidos de Patente norte-americano Nos. 20020123141, 20030032179 e 2005011871. Contudo, esse procedimento está limitado a até 24 horas depois de a placenta ser isolada e envolve perfusão, portanto, desenvolvimento em massa das células e não é possível sua manutenção por períodos prolongados de tempo.

Existe, então, uma necessidade amplamente reconhecida e seria altamente vantajoso ter novos métodos de expansão celular e usos de células e meios condicionados produzidos através dos mesmos para terapia e que não possuam as limitações acima.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com um aspecto da presente invenção, é previsto um método de expansão celular, o método compreendendo realizar a cultura de células aderentes da placenta ou tecido adiposo sob condições de cultura tridimensional, as quais suportam a expansão celular.

De acordo com um outro aspecto da presente invenção, é previsto um método para produzir um meio condicionado, o

método compreendendo: realizar a cultura de células aderentes de uma placenta ou tecido adiposo em condições de cultura tridimensional que permitem a expansão celular; e colher um meio condicionado das células aderentes expandidas, produzindo assim o meio condicionado.

Ainda de acordo com um outro aspecto da presente invenção, é prevista uma população de células geradas de acordo com o método acima.

Ainda de acordo com um outro aspecto da presente invenção, é prevista uma população isolada de células compreendendo células aderentes da placenta ou tecido adiposo, na qual as células aderentes secretam um nível mais elevado de pelo menos um fator selecionado do grupo que consiste de SCF, IL-6 e Flt-3 do que o secretado pelas células aderentes da placenta ou tecido adiposo desenvolvidas em cultura 2D.

De acordo com um aspecto adicional da presente invenção, é prevista uma população isolada de células compreendendo células aderentes da placenta ou tecido adiposo, na qual as células aderentes expressam um nível mais elevado de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste da família da histona H2A (H2AF), Aldeído desidrogenase X (ALDH X), fator de alongamento eucariótico de translação 2 (EEEF2), reticulocalbina 3, domínio fixador de cálcio EF-hand (RCN2) e músculo liso básico calponina 1 (CNN1) do que o expressado por células aderentes da placenta ou tecido adiposo desenvolvidas em cultura 2D.

VER PARAGRAFO [0026] ENTRA NÃO ENTRA

De acordo ainda com um aspecto adicional da presente

invenção, é prevista uma população isolada de células compreendendo células aderentes da placenta ou tecido adiposo, na qual as células aderentes expressam um nível mais baixo de expressão de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste de ribonucleoproteína nuclear heterogênea H1 (Hnrph1), precursor CD44 da isoforma 2 do antígeno, 3 fosfoadenosina 5 sintase de fosfossulfato 2 isoforma a (Papss2) e proteína ribossômica L7a (rpL7a) do que o expressado por células aderentes da placenta ou tecido adiposo desenvolvidas em cultura 2D.

Ainda de acordo com um aspecto adicional da presente invenção, é prevista uma população isolada de células aderentes da placenta ou tecido adiposo, na qual as células aderentes são caracterizadas por uma atividade imunossupressora maior do que a das células aderentes da placenta ou tecido adiposo desenvolvidas em cultura 2D.

De acordo com outras características dos modos de realização preferidos da invenção descritos abaixo, a atividade imunossupressora compreende redução da proliferação de células T.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, é prevista uma composição farmacêutica compreendendo, como ingrediente ativo, a população de células geradas de acordo com o método acima.

De acordo ainda com outro aspecto da presente invenção, é prevista uma composição farmacêutica compreendendo, como ingrediente ativo, o meio condicionado produzido de acordo com o método acima.

De acordo ainda com outro aspecto da presente invenção, é

prevista uma composição farmacêutica compreendendo, como ingrediente ativo, a população de células isolada de acordo com o acima.

De acordo ainda com outro aspeto da presente invenção, é previsto um método para tratar uma condição que pode beneficiar-se do transplante de células estromais em um indivíduo com essa necessidade, o método compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficiente de células aderentes de um tecido selecionado do grupo que consiste de placenta e tecido adiposo, tratando desse modo a condição do indivíduo que pode se beneficiar do transplante de células-tronco.

De acordo ainda com outro aspeto da presente invenção, é previsto um método para tratar uma condição que pode beneficiar-se do transplante de células estromais em um indivíduo com essa necessidade, o método compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficiente de um meio condicionado de células aderentes obtidas de um tecido selecionado do grupo que consiste de placenta e tecido adiposo, tratando desse modo a condição do indivíduo que pode se beneficiar do transplante de células-tronco.

De acordo ainda com outro aspeto da presente invenção, é previsto um método para reduzir a resposta imunológica de um indivíduo com essa necessidade, o método compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficiente da população isolada de células das reivindicações 3, 4, 5, 6, ou 7, de modo a reduzir a resposta imunológica do indivíduo.

De acordo ainda com outras características dos modos de

realização preferidos descritos, o indivíduo é tratado com terapia celular.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, o método compreende ainda administrar células- tronco.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, as células-tronco compreendem células-tronco hematopoiéticas.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, as células são administradas concomitantemente ao meio condicionado ou células aderentes.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, as células são administradas em seguida à administração do meio condicionado ou de células aderentes.

características dos modos de realização preferidos descritos, as células aderentes são obtidas a partir de uma cultura tridimensional.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, as células aderentes são obtidas a partir de uma cultura bidimensional.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, a condição é selecionada a partir do grupo de deficiência de células-tronco, doença cardíaca, doença de Parkinson, câncer, mal de Alzheimer, derrame, queimaduras, perda de tecido, perda de sangue,

anemia, doenças auto- imunes, diabetes, artrite, Esclerose Múltipla, doença enxerto-hospedeiro (GvHD), doenças neurodegenerativas, encefalomielite autoimune (EAE), lúpus sistêmico eritematoso (SLE), artrite reumatoide, esclerose sistêmica, síndrome de Sjorgen, esclerose múltipla (MS), Miastenia Gravis (MG), Síndrome de Guillain-Barré (GBS), Tiroidite de Hashimoto (HT), Doença de Graves, Diabetes Melitus Insulino- dependente (IDDM) e Doença Intestinal Inflamatória.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, a cultura tridimensional compreende um biorreator 3D.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, o biorreator é selecionado a partir do grupo que consiste de um biorreator de fluxo constante, um biorreator de tanque de mistura e um biorreator de leito estacionário.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, a cultura das células é efetuada sob um fluxo contínuo de um meio de cultura.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, a cultura tridimensional compreende um material aderente selecionado a partir do grupo que consiste de um poliéster, um polialquileno, um polifluorcloroetileno, um cloreto polivinílico, um poliestireno, uma polissulfona, um acetato de celulose, uma fibra de vidro, uma partícula cerâmica, matrigel, um componente de matriz extracelular, um colágeno, um ácido láctico poli-L e uma fibra metálica inerte.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, a cultura é efetuada por pelo menos 3 dias.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, a cultura é efetuada por pelo menos 3 dias.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, a cultura é efetuada até que as células aderentes atinjam pelo menos 60% de confluência.

características dos modos de realização preferidos descritos, a condição pode se beneficiar da facilitação do enxerto de células-tronco hematopoiéticas.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, as células aderentes compreendem um conjunto de expressões de marcadores positivos selecionadas a partir do grupo que consiste de CD73, CD90, CD29 e CD105.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, as células aderentes compreendem um conjunto de expressões de marcadores negativos selecionadas a partir do grupo que consiste de CD45, CD80, H1A-DR, CD11b, CD14, CD19, CD34 e CD79.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, as células aderentes secretam um nível maior de pelo menos um fator selecionado a partir do grupo que consiste de SCF, Flt-3 e IL-6 do que o secretado pelas células aderentes da placenta ou tecido

adiposo desenvolvidas em uma cultura 2D.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, as células aderentes secretam um nível maior de pelo menos uma proteína selecionada a partir do grupo que consiste da família da histona H2A (H2AF), Aldeído desidrogenase X (ALDH X), fator de alongamento eucariótico de translação 2 (EEEF2), reticulocalbina 3, domínio fixador de cálcio EF-hand (RCN2) e músculo liso, básico, calponina 1 (CNN1) do que o secretado por células aderentes da placenta ou tecido adiposo desenvolvidas em uma cultura 2D.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, as células aderentes expressam um nível menor de expressão de pelo menos uma proteína selecionada a partir do grupo que consiste de ribonucleoproteína nuclear heterogênea H1 (Hnrph1), precursor CD44 da isoforma 2 do antígeno, 3 fosfoadenosina 5 sintase de fosfossulfato 2 isoforma a (Papss2) e proteína ribossômica L7a (rpL7a) do que o secretado por células aderentes da placenta ou tecido adiposo desenvolvidas em uma cultura 2D.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, as células aderentes ou meio são caracterizadas por uma atividade imunossupressora maior do que a das células aderentes da placenta ou tecido adiposo desenvolvidas em uma cultura 2D.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, a atividade imunossupressora compreende redução da proliferação de células T.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, as células compreendem ter um fenótipo de célula- tronco estromal.

características dos modos de realização preferidos descritos, o fenótipo de célula-tronco estromal compreende atividade de supressão de células T.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, o fenótipo de célula-tronco estromal compreende a atividade de suporte de células-tronco hematopoiéticas.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, o uso da população celular descrita acima é para fabricação de um medicamento identificado para transplante.

A presente invenção aborda com sucesso as desvantagens das configurações atualmente conhecidas, fornecendo métodos novos de expansão celular e usos de células e meio condicionado produzido através dos mesmos para terapia.

A menos que definido de modo contrário, todos os termos técnicos e científicos utilizados neste documento possuem o mesmo significado normalmente compreendido por uma pessoa com conhecimentos normais da técnica à qual pertence a presente invenção. Embora na prática ou em testes da presente invenção possam ser utilizados métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos aqui descritos, abaixo se encontram descritos métodos e materiais adequados. No caso de conflito, o relatório da patente, incluindo definições, prevalecerá. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são ilustrativos somente e não se destinam a ser

limitadores.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A invenção é aqui descrita, a título de exemplo somente, com referência aos desenhos anexos. Agora, com referência específica aos detalhes dos desenhos, destaca-se que as particularidades ilustradas são dadas a título de exemplo e com a finalidade de discussão ilustrativa dos modos de realização preferidos da presente invenção somente e são apresentadas com a intenção de fornecer o que se acredita ser a descrição mais útil e prontamente compreensível dos princípios e aspetos conceituais da invenção. A esse respeito, não se faz nenhuma tentativa de mostrar detalhes estruturais da invenção com mais detalhes do que o necessário para uma compreensão básica da invenção, a descrição tomada com os desenhos tornando evidente aos técnicos no assunto como as várias formas da invenção podem ser realizadas na prática.

Nos desenhos:

as figuras 1a-g ilustram o microambiente tipo osso criado no sistema do biorreator contendo transportadores 3-D. As Figuras 1a-b são micrografias por elétron ilustrando a comparação do osso natural (Figura 1a) e a estrutura do transportador PluriX™3D 7 dias após a fertilização de Células Estromais Aderentes (3D-ASC), imitando o microambiente ósseo (Figura 1b). As figuras 1c-f são micrografias por elétron ilustrando a matriz PluriX™ 3D fertilizada com 3D-ASC, produzida a partir da medula óssea, 20 dias (Figuras 1c-d, ampliadas 150 e 250 vezes, respectivamente) e 40 dias (Figuras 1e-f, ampliadas 350

e 500 vezes, respetivamente) após a fertilização. A Figura 1g é um diagrama do biorreator de fluxo constante Plurix 3D com partes separadas definidas por números: Reservatório de meio de cultura (1), suprimento de mistura de gás (2), filtro (3), ponto de injeção (4), coluna na qual os transportadores 3D são colocados (5), monitor de fluxo (6), válvula de fluxo (6a), recipiente separador (7), analisadores de crescimento de células (8); bomba peristáltica (9), ponto de amostragem (10), eletrodo de medição de O₂ dissolvido (11), eletrodo de medição de pH (12) sistema de controlo (13), meio de crescimento fresco (14), meio de crescimento usado (15);

a Figura 2 é um gráfico ilustrando diferentes lotes de produção de células estromais aderentes (3D- ASC; Lotes 5-8) obtidas da placenta, desenvolvidas em condições de crescimento 3D dentro dos sistemas de biorreator. As ASCs (2×10^6) foram fertilizadas no biorreator a uma densidade de 10000 - 15000 células/um transportador. Em seguida a uma cultura de 12 dias, 3D-ASCs atingiram uma densidade entre 150.000-250.000 células/transportador ou $22,5-37,5 \times 10^6$ em um biorreator contendo 150 transportadores;

as Figuras 3a-b são gráficos de barras ilustrando a diferença dos níveis de expressão dos marcadores de membrana expressos em 3D-ASCs obtidas da placenta (roxo escuro), em comparação aos marcadores de membrana nas células da placenta submetidas à cultura em condições de cultura 2D convencional (roxo claro). As células aderentes foram desenvolvidas durante 4-6 semanas em frascos (2D) ou durante 2-3 semanas no sistema do biorreator, em transportadores de poliestireno (3D). Em seguida à extração dos frascos ou transportadores, as células foram incubadas e

fixadas a um painel de anticorpos monoclonais (MAb), os quais reconhecem os marcadores de membrana característicos das MSCs (Figura 3a), ou células hematopoiéticas (Figura 3b). Observe a expressão significativamente mais alta de marcadores de membrana MSC em células de cultura 2D, conforme ilustrado para os marcadores de membrana CD90, CD105, CD73 e CD29, comparados aos marcadores de membrana MSC expressos em células aderentes de cultura 3D, especialmente CD105, que mostraram 56% de expressão em células de cultura 3D contra 87% nas células de cultura 2D (Figura 3a). As ASCs de ambas as culturas 2D e 3D não expressaram nenhum marcador de membrana hematopoiética (Figura 3b);

as figuras 4a-d são gráficos de barra que ilustram uma comparação dos níveis de proteína em ASCs produzidas a partir da placenta submetida à cultura em condições 2D e 3D ou meios condicionados das mesmas. As Figuras 4a-c ilustram níveis de ligante Flt-3 (Figura 4a), IL-6 (Figura 4b) e SCF (Figura 4c) em pg/ml, normalizados para 1×10^6 células/ml, conforme analisado por ELISA, nos meios condicionados de ASCs de cultura 2D e 3D. Os resultados representam um de três experimentos independentes. A Figura 4d ilustra os níveis de expressão de diferentes proteínas celulares, conforme analisado por espectrometria em massa com reagentes iTRAQ, amostras de proteínas rotuladas comparadas entre si. As amostras de proteína foram extraídas das ASCs desenvolvidas sob condições 2D (barras brancas) e 3D (barras cinza). A figura representa um de dois experimentos replicados. Observe a diferença do nível de expressão de algumas das proteínas em células e meios condicionados de condições de cultura 2D e 3D; as figuras 5a-d são micrografias ilustrando a

capacidade de diferenciação *in vitro* das 3D-ASCs obtidas da placenta em osteoblastos. As ASCs obtidas da placenta humana foram submetidas à cultura em um meio de indução osteogênica (DMEM contendo 10% de FCS, 100 nM de dexametasona, 0,05 mM de ácido ascórbico 2-fosfato, 10 mM de B- glicerofosfato) por um período de 3 semanas. As Figuras 5a-b mostram células que expressam matriz calcificada, conforme indicado por coloração com Vermelho S Alizzarin. As Figuras 5c-d mostram células de controle, as quais não foram tratadas com meio de indução osteogênica e mantiveram um fenótipo tipo fibroblasto e não demonstraram mineralização;

a figura 6 é um gráfico ilustrando a percentagem de células CD45+ humanas detetadas na medula óssea (BM) de ratinhos NOD-SCID tratados com quimioterapia (25 mg/kg de injeções intraperitoneais de bussulfano durante duas semanas consecutivas) 3,5 semanas depois do transplante. Células CD34 + (100.000) purificadas de células obtidas do sangue do cordão mononuclear foram transplantadas isoladamente (5 ratinhos a) ou co- transplantadas com $0,5 \times 10^6$ células aderentes obtidas da placenta submetidas a condições de cultura 2D (2D-ASC; 2 ratinhos, b), ou células aderentes obtidas da placenta submetidas a condições de cultura 3D (3D-ASC) no biorreator PluriX™ (5 ratinhos, c). BM foi então coletada do fêmur e tíbia dos ratinhos. As células humanas da BM foram detetadas por citometria de fluxo. A percentagem de CD45 expressando células humanas foi determinada incubando as células com CD45-FITC anti-humano. Observe a maior percentagem de células humanas (hCD45+) na medula óssea de ratinhos transplantados com 2D-ASC (b) assim como com 3D-ASC (c) em comparação à percentagem de células humanas nos

ratinhos tratados com HSCs isoladamente (a). O maior enxerto visto em ratinhos tratados com células submetidas à cultura 3D-ASC em comparação a ratinhos tratados com células submetidas à cultura 2D-ASC indica uma vantagem terapêutica maior exclusiva das ASCs submetidas à cultura 3D;

as figuras 7a-b são análises FACS de enxerto humano de células CD45+ em ratinhos transplantados com células CD34+ somente (Figura 7a) em comparação a células CD34+ juntamente com tecido adiposo obtido de ASCs (Figura 7b). Observe a percentagem significativamente maior da população hematopoiética humana (hCD45+) (7a - 29%) em um ratinho co-transplantado com ASC obtida de tecido adiposo em comparação a um ratinho tratado com CD34 + humana isoladamente (7b-12%);

a Figura 8 é um gráfico de barras que ilustra uma reação de linfócitos mistos conduzida entre células mononucleares do sangue do cordão humano (CB) e iguais quantidades de células do sangue do cordão expostas a radiação (3000 Rad) (iCB), monócitos extraídos do sangue periférico humano (PBMC), ASCs placentárias submetidas à cultura 2D ((2D) ou cultura 3D (3D), ou uma combinação de PBMC e ASCs placentárias submetidas à cultura 2D e 3D (PBMC+2D e PBMC+3D). O tamanho da população de células CB é representado pela absorção de 3H-timidina (medida em CPM) que foi medida durante as últimas 18 horas de cultura. A elevação na proliferação estimulada de células CB indica uma resposta imunológica de nível maior. Observe o nível menor de resposta imunológica demonstrado por células incubadas com células aderentes e, em particular, a redução da resposta imunológica de CB às PBMCs quando co incubadas com células aderentes. Foram feitas três réplicas de cada reação.

DESCRIÇÃO DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

A presente invenção é de métodos novos para expansão celular e usos de células e meio condicionado produzidos através dos mesmos para terapia relacionada a células-tronco, enxerto de células-tronco e suporte HSC.

Os princípios e operação da presente invenção podem ser mais bem compreendidos com referência aos desenhos e descrições anexas.

Antes de explicar em detalhes pelo menos um modo de realização da invenção, deve-se compreender que a invenção não está limitada em sua aplicação aos detalhes estabelecidos na descrição que se segue ou exemplificada pelos Exemplos. A invenção é passível de outros modos de realização ou de ser praticada ou realizada de várias maneiras. Também, deve-se compreender que a fraseologia e a terminologia são aqui empregadas com a finalidade de descrição e não devem ser consideradas como limitadoras.

No mundo médico em desenvolvimento, existe uma crescente necessidade de células-tronco e, mais especificamente, células-tronco estromais (também chamadas de "células-tronco mesenquimais") para fins clínicos e de pesquisa. As MSCs são utilizadas para suporte de transplante e enxerto de HSC e também para curar um número crescente de condições, tais como, doenças cardíacas, deficiências BM, doenças neuronais e condições que necessitem de transplante de órgão ou tecido.

Os obstáculos ao uso de células-tronco residem na dificuldade técnica de isolar grandes quantidades de

populações de células-tronco ou progenitoras que normalmente ocorre devido à quantidade limitada dessas células na maioria dos tecidos, o desconforto e o risco envolvidos nos procedimentos para obtenção de células-tronco e a perda que se segue de células B de memória e células-tronco hematopoiéticas com os atuais procedimentos de extração. Obter células do embrião humano acrescenta um aspecto religioso e ético às dificuldades técnicas já existentes.

Fontes alternativas de células-tronco obtidas da medula óssea incluem tecidos adiposos e placenta. Contudo, atualmente não existem métodos para expansão eficiente de células-tronco desses tecidos.

Durante a colocação da presente invenção em prática, os presentes inventores descobriram que as células aderentes da placenta ou do tecido adiposo podem ser propagadas de maneira eficiente em condições de cultura 3D. De modo surpreendente, os presentes inventores descobriram que essas células compreendem propriedades funcionais semelhantes às das MSCs e, portanto, essas células e o meio condicionado produzido a partir delas, podem ser usados para fins terapêuticos, tais como transplante, regeneração de tecido e suporte HSC in vivo.

Conforme ilustrado aqui abaixo e na parte de Exemplos que se segue, os presentes inventores conseguiram expandir células aderentes obtidas do tecido adiposo e da placenta compreendendo propriedades de células-tronco estromais em configurações 3D. As células assim expandidas foram consideradas viáveis, depois de criopreservação, conforme evidenciado pelos ensaios de aderência e re-população (veja Exemplo 1). A análise de citometria de fluxo das células aderentes obtidas da placenta descobriu um padrão de

expressão de marcador distinto (veja as Figuras 3a-b). Mais importante, as células aderentes obtidas do tecido adiposo e da placenta propagadas em configurações 2D ou 3D eram capazes de suportar enxerto de HSC (veja Exemplo 2), consubstanciando o uso na prática clínica das células da presente invenção como células-tronco estromais.

Assim, de acordo com um aspeto da presente invenção, é previsto um método de expansão celular.

O método compreendendo a cultura de células aderentes da placenta ou tecido adiposo sob condições de cultura tridimensional (3D) que aceitam expansão celular.

Conforme aqui usados, os termos "expandir" e "expansão" referem-se à manutenção das células substancialmente sem diferenciação e, em última análise, o crescimento celular, i.e., o aumento de uma população de células (por exemplo, pelo menos 2 vezes) sem a diferenciação que acompanha esse aumento.

Conforme aqui usados, os termos "manter" e "manutenção" referem-se à renovação celular substancialmente sem diferenciação, i.e., população celular substancialmente estacionária sem a diferenciação que acompanha essa estacionaridade.

Conforme aqui usada, a frase "células aderentes" refere-se a uma população de células homogêneas ou heterogêneas que são dependentes de ancoragem, e necessitam de fixação a uma superfície a fim de crescer in vitro.

Conforme aqui usada, a frase "tecido adiposo" refere-se a um tecido conetivo que compreende células de gordura

(adipócitos).

Conforme aqui usado, o termo "tecido placentário" refere-se a qualquer parte do órgão feminino mamífero que reveste a parede do útero e durante a gravidez envolve o feto à qual é preso pelo cordão umbilical. Depois do nascimento, a placenta é expelida (e é chamada de placenta pós-parto).

Conforme aqui usada, a frase "condições de cultura tridimensional" refere-se à disposição das células em condições que sejam compatíveis com o crescimento celular ao mesmo tempo em que permite que as células se desenvolvam em mais de uma camada. É bem reconhecido o ambiente in situ de uma célula em um organismo vivo (ou tecido) como uma arquitetura tridimensional. As células são circundadas por outras células. São mantidas em uma rede complexa de fibras em nano-escala da matriz extracelular que permite o estabelecimento de vários microambientes locais. Seus ligantes extracelulares não realizam somente a mediação da fixação à membrana basal, como também o acesso a uma variedade de vasos vasculares e linfáticos. Oxigênio, hormônios e nutrientes são transportados às células e os produtos residuais são removidos. As condições de cultura tridimensional da presente invenção são desenvolvidas para imitar esse microambiente como exemplificado abaixo.

Assim, células aderentes deste aspeto da presente invenção são recuperadas de um tecido adiposo ou placentário.

As células placentárias podem ser obtidas a partir de uma placenta a pleno termo ou pré-termo. De preferência, as placentas são recolhidas uma vez tenha cessado o sangramento. A placenta é, de preferência, perfundida por um período de tempo suficiente para remover as células residuais. O termo "perfundir" ou "perfusão" aqui utilizado

refere-se ao ato de despejar ou passar um fluido sobre ou através de um órgão ou tecido. O tecido placentário pode ser de qualquer mamífero, mais preferivelmente o tecido placentário é humano. Uma fonte conveniente de tecido placentário é de uma placenta pós-parto (por exemplo, 1-6 horas), contudo, a fonte de tecido placentário ou de células ou o método de isolar o tecido placentário não é essencial para a invenção.

As células aderentes extraídas da placenta podem ser obtidas tanto das partes da placenta fetal (i.e., âmnio ou partes internas da placenta, veja Exemplo 1) como maternal (i.e. decídua basalis e decídua parietalis). Os espécimes de tecido são lavados em tampão fisiológico (por exemplo, solução salina tamponada por fosfato (PBS) ou tampão de Hank). As suspensões em célula única são feitas tratando o tecido com uma enzima digestiva (veja abaixo) e/ou triturando e escorrendo as partes do tecido em um filtro de nylon ou transferindo suavemente por pipeta (Falcon, Beton, Dickinson, San Jose, CA) com o meio de lavagem.

As células aderentes obtidas de tecido adiposo podem ser isoladas por meio de uma variedade de métodos conhecidos por aqueles versados na técnica. Por exemplo, esses métodos estão descritos na Patente norte-americana N° 6.153.432. O tecido adiposo pode ser extraído de locais de tecido omental/visceral, mamário, gonadal ou outros locais com tecido adiposo. Uma fonte preferida de tecido adiposo é o tecido adiposo omental. Em humanos, o tecido adiposo é geralmente isolado por lipossucção.

Células aderentes isoladas do tecido adiposo podem ser obtidas tratando o tecido com uma enzima digestiva, como por exemplo, collagenase, tripsina e/ou dispase e/ou

concentrações eficientes de hialuronidase ou DNase; e ácido etilenodiaminatetra-acético (EDTA); a temperaturas entre 25-50°C, por períodos entre 10 minutos e 3 horas. As células podem então ser passadas por um filtro de trama de nylon ou gaze de algodão entre 20 micra a 800 micra. As células são então submetidas à centrifugação diferencial diretamente nos meios ou em Ficoll ou Percoll ou outro gradiente particulado. As células são centrifugadas a velocidades entre 100 e 3000 x g por períodos entre 1 minuto até 1 hora a temperaturas entre 4-50°C (veja a Patente norte-americana N° 7.078.230).

Além de células aderentes extraídas da placenta ou tecido adiposo, a presente invenção também contempla o uso de células aderentes de outras fontes de células que são caracterizadas pelo fenótipo de células-tronco estromais (como será ainda descrito aqui abaixo). As fontes de tecido das quais podem ser retiradas células aderentes incluem, mas não se limitam ao sangue do cordão, folículos capilares [por exemplo, conforme descrito no Pedido de Patente norte-americano 20060172304], testículos [por exemplo, conforme descrito em Guan K. e outros, *Nature*. 2006 Apr 27;440 (7088) :1199-203], mucosa olfativa humana [por exemplo, conforme descrito em Marshall, CT. e outros, *Histol Histopathol*. 2006 Jun;21(6):633-43], saco vitelino embrionário [por exemplo, conforme descrito em Geijsen N, *Nature*. 2004 Jan 8;427(6970):148-54] e líquido amniótico [Pieternella e outros (2004) *Stem Cells* 22:1338-1345], todos eles conhecidos por incluir células-tronco mesenquimais. Células aderentes dessas fontes de tecido podem ser isoladas realizando a cultura das células em uma superfície aderente, isolando assim as células aderentes de outras células na população inicial.

Independente da origem (por exemplo, placenta ou tecido adiposo), de preferência, a retirada da célula é realizada sob condições estéreis. Assim que as células isoladas são obtidas, permite-se sua adesão a um material aderente (por exemplo, configurado como uma superfície) e, através dele, isolar as células aderentes. Isso pode ser efetuado antes (veja o Exemplo 1) ou concomitantemente à cultura em condições de cultura 3D.

Conforme aqui utilizado, "um material aderente" refere-se a um material não-citotóxico (i.e., biologicamente compatível) sintético, que ocorre normalmente ou uma combinação que possui uma estrutura química (por exemplo, grupos expostos com superfície carregada) capazes de reter as células em uma superfície.

Exemplos de materiais aderentes que podem ser usados de conformidade com este aspecto da presente invenção incluem, mas não se limitam a, um poliéster, um polialquileno, um polifluorcloroetileno, um cloreto polivinílico, um poliestireno, uma polissulfona, um acetato de celulose, uma fibra de vidro, uma partícula cerâmica, matrigel, um componente de matriz extracelular (por exemplo, fibronetina, condronetina, laminina), um colagénio, um ácido láctico poli-L e uma fibra de metal inerte.

Outras etapas da purificação ou enriquecimento de células-tronco estromais podem ser realizadas usando métodos que são bem conhecidos na técnica (tais como por FACS usando expressão de marcador de células-tronco estromais, conforme descrito aqui abaixo).

Exemplos não limitadores de meios de base úteis na cultura, de acordo com a presente invenção, incluem Meio Mínimo

Essencial Eagle, ADC-1, LPM (Soro Bovino Sem Albumina), F10(HAM), F12(HAM), DCCM1, DCCM2, RPM1 1640, Meio BGJ (com e sem Modificação Fitton-Jackson), Meio Basal Eagle (BME-com adição de base de sal de Earle), Meio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM-sem soro), Yamane, IMEM-20, Meio Eagle de Modificação Glasgow (GMEM), Meio Leibovitz L-15, Meio 5A de McCoy, Meio M199 (M199E-com base de sal de Earle), Meio M199 (M199H-com base de sal de Hank), Meio Mínimo Essencial Eagle (MEM-E-com base de sal de Earle), Meio Mínimo Essencial Eagle (MEM-H-com base de sal de Hank) e Meio Mínimo Essencial Eagle (MEM-NAA com aminoácidos não essenciais), dentre numerosos outros, incluindo meio 199, CMRL 1415, CMRL 1969, CMRL 10⁶6, NCTC 135, MB 75261, MAB 8713, DM 145, Williams' G, Neuman & Tytell, Higuchi, MCDB 301, MCDB 202, MCDB 501, MCDB 401, MCDB 411, MDBC 153. Um meio preferido para uso na presente invenção é DMEM. Esses e outros meios úteis estão disponíveis na GIBCO, Grand Island, N.Y., EUA e Biological Industries, Bet Ha'Emek, Israel, dentre outras. Uma série desses meios se encontra resumida em *Methods in Enzymology*, Volume LVIII, "Cell Culture", PP. 62 72, editado por William B. Jakoby e Ira H. Pastan, publicado pela Academic Press, Inc.

O meio pode ser suplementado, por exemplo, com soro, tal como soro fetal bovino ou outras espécies e, opcional ou alternativamente, fatores de crescimento, citocinas e hormônios (por exemplo, hormônio do crescimento, eritropoietina, trombopoietina, interleucina 3, interleucina 6, interleucina 7, fator estimulante de colônia de macrófagos, c-kit fator ligante/célula-tronco, ligante de osteoprotegerina, insulina, fatores de crescimento tipo insulina, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento de fibroblasto, fator de crescimento de nervos, fator neurotrófico ciliar, fator de crescimento

obtido de plaqueta e proteína morfogenética do osso em concentrações de níveis entre pigograma/ml até miligrama/ml.

Ainda é reconhecido que podem ser acrescentados componentes adicionais ao meio de cultura. Esses componentes podem ser antibióticos, antimicóticos, albumina, aminoácidos e outros componentes conhecidos na técnica para a cultura de células. Além disso, podem ser acrescentados componentes para melhorar o processo de diferenciação quando necessário (veja mais abaixo).

Uma vez as células aderentes estejam à mão, podem ser passadas para configurações tridimensionais (veja Exemplo 1 da parte de Exemplos que segue). Será observado, no entanto, que as células podem ser transferidas para uma matriz configurada em 3D, imediatamente após o isolamento (conforme mencionado aqui acima).

Assim, o material aderente deste aspeto da presente invenção é configurado para cultura 3D, proporcionando assim uma matriz de crescimento que aumenta substancialmente a superfície de fixação disponível para a adesão das células estromais, de modo a imitar a infra-estrutura do tecido (por exemplo, placenta).

Por exemplo, para uma matriz de crescimento de 0,5mm de altura, o aumento é de um fator de pelo menos 5 a 30 vezes, calculado pela projeção sobre uma base da matriz de crescimento. Esse aumento em um fator de cerca de 5 a 30 vezes é por camada de unidade e se for usada uma pluralidade dessas camadas, seja empilhadas ou separadas por espaçadores ou similar, o fator de 5 a 30 vezes se aplica a cada uma dessas estruturas. Quando é usada a

matriz em forma de lâmina, de preferência lâminas de fibra não trançada, ou lâminas de polímeros de espuma com poros abertos, a espessura preferida da laminada é de cerca de 50 a 1000 μm ou mais, sendo prevista a porosidade adequada para entrada das células, entrada de nutrientes e para a remoção de produtos residuais da lâmina. De acordo com um modo de realização preferido, os poros possuem um diâmetro efetivo de 10 μm a 100 μm . Essas lâminas podem ser preparadas a partir de fibras de várias espessuras, sendo a espessura de fibra preferida ou faixa de diâmetro de fibra entre cerca de 0,5 μm e 20 μm , ainda mais preferíveis são as fibras na faixa de 10 μm e 15 μm de diâmetro.

As estruturas da invenção podem ser apoiadas por, ou ainda melhor fixadas a uma lâmina porosa de suporte ou tela proporcionando estabilidade dimensional e resistência física.

Essas lâminas de matriz também podem ser cortadas, perfuradas ou retalhadas para fornecer partículas com área projetada da ordem de cerca de 0,2 mm^2 até cerca de 10 mm^2 , com a mesma ordem de espessura (cerca de 50 a 1000 μm).

Outros detalhes relativos à fabricação, uso e/ou vantagens da matriz de crescimento que foi usada para colocar a presente invenção em prática são descritos na Patente norte-americana N° 5.168.085 e, em especial, na patente norte-americana N° 5.266.476, ambas aqui incorporadas por referência.

A superfície aderente pode possuir um formato selecionado do grupo que consiste de quadrados, anéis, discos e cruciformes.

Para produção em alta escala, a cultura é realizada de preferência em um biorreator 3D.

Exemplos desses biorreatores incluem, mas não estão limitados a um biorreator de fluxo constante, um biorreator de tanque de mistura contínua e um biorreator de leito estacionário.

Conforme ilustrado no Exemplo da parte de Exemplos, um biorreator de fluxo constante tridimensional (3D) (conforme descrito na Patente norte-americana N° 6911201) é capaz de suportar o crescimento e manutenção prolongada de células estromais. Nesse biorreator, as células estromais são fertilizadas em transportadores porosos feitos de uma matriz de tecido não trançado de poliéster, embaladas em coluna de vidro, possibilitando desse modo a propagação de grandes números de células em um volume relativamente pequeno.

A matriz usada no biorreator de fluxo constante pode ser na forma de lâmina, lâminas de tecido não trançado ou lâminas de polímeros com espuma de poro aberto, sendo a espessura preferida da lâmina de cerca de 50 a 1000 μ m ou mais, sendo provida porosidade adequada para a entrada da célula, entrada de nutrientes e para a remoção de produtos residuais da lâmina.

Ouros biorreatores 3D podem ser utilizados com a presente invenção e incluem, mas não se limitam a um biorreator de tanque de mistura contínua, no qual um meio de cultura é constantemente alimentado ao biorreator e um produto é constantemente drenado para manter o estado estável constante no tempo dentro do reator. Um biorreator de tanque de mistura com um cesto de leito fibroso pode ser

encontrado, por exemplo, na New Brunswick Scientific Co., Edison NJ. Um biorreator de leito estacionário, um biorreator de suspensão a ar, no qual o ar é geralmente alimentado no fundo de um tubo de corrente de ar central e flui para cima durante a formação de bolhas e desengatando o gás de escape no topo da coluna, um biorreator de perfusão para fertilização de células com espumas poliativas [conforme descrito em Wendt, D. e outros, *Biotechnol Bioeng* 84:205-214, (2003)], ácido lático poli-L tubular (PLLA), plataformas porosas em um Biorreator de perfusão de fluxo radial [conforme descrito em Kitagawa e outros, *Biotechnology and Bioengineering* 93(5) : 947-954 (2006)].

Outros biorreatores que podem ser usados de acordo com a presente invenção estão descritos nas Patentes norte-americanas n.ºs. 6.277.151, 6.197.575, 6.139.578, 6.132.463, 5.902.741 e 5.629.186.

De preferência, a fertilização celular é efetuada com 100.000-1.5000.000 células/mm por fertilização.

De preferência, as células são extraídas assim que atingirem pelo menos 40% de confluência, 60% de confluência e 90% de confluência, embora de preferência, evitando diferenciação e envelhecimento descontrolados.

A cultura é realizada por pelo menos cerca de 2 dias, 3 dias, 5 dias, 10 dias, 20 dias, um mês ou até mais. Será verificado que a cultura em um biorreator pode prolongar esse período. A passagem também pode ser realizada para aumentar o número de células.

As células aderentes da presente invenção compreendem, de preferência, pelo menos um "fenótipo de célula-tronco

estromal".

Conforme aqui utilizado, "um fenótipo de célula-tronco estromal" refere-se a um fenótipo estrutural ou funcional típico de uma célula-tronco estromal obtida da medula óssea (i.e. mesenquimal).

Conforme aqui utilizada, a frase "célula-tronco" refere-se a uma célula que não é terminalmente diferenciada.

Assim, por exemplo, as células podem possuir o formato de fuso. Alternativamente ou, além disso, as células podem expressar um marcador ou uma coleção de marcadores (por exemplo, marcador de superfície) típicos das células-tronco estromais. Exemplos de marcadores de superfície de células-tronco estromais (positivos e negativos) incluem, mas não se limitam a CD105+, CE29+, CD44+, CD73+, CD90+, CD34-, CD45-, CD80-, CD19-, CD5-, CD20-, CD11B-, CD14-, CD19-, CD79-, H1A-DR- e FMC7-. Outros marcadores de células-tronco estromais incluem, mas não se limitam à hidroxilase de tirosina, nestina e H-NF.

Exemplos de fenótipos funcionais típicos das células-tronco estromais incluem, mas não se limitam à atividade de supressão de células T (não estimulam as células T e, inversamente, as suprimem), atividade de suporte de células-tronco hematopoiéticas, bem como diferenciação adipogênica, hepatogênica, osteogênica e neurogênica.

Quaisquer dessas características estruturais ou funcionais podem ser usadas para qualificar as células da presente invenção (veja Exemplos 1-2 da parte de Exemplos que se segue).

As populações de células geradas de acordo com os presentes ensinamentos são caracterizadas por um perfil único de expressão de proteína, conforme mostrado no Exemplo 1 da parte de Exemplos. Então, por exemplo, as células aderentes da placenta ou tecido adiposo geradas de acordo com os presentes ensinamentos, são capazes de expressar e/ou secretar altos níveis de fatores selecionados. Por exemplo, essas células expressam ou secretam um nível de SCF, Flt-3, H2AF ou ALDH X pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou de preferência 12 vezes maior que o expressado ou secretado pelas células aderentes da placenta ou tecido adiposo desenvolvidas em cultura 2D. Além disso, ou alternativamente, a população de células da presente invenção secreta ou expressa um nível de IL-6, EEEF2, RCN2 ou CNN1 pelo menos 2, 3, ou 5 vezes maior que o expressado ou secretado pelas células aderentes da placenta ou tecido adiposo desenvolvidas em cultura 2D. Além disso, ou alternativamente, as populações de células da presente invenção são caracterizadas pelo nível mais baixo de expressão de várias outras proteínas, se comparadas às células de cultura 2D. Assim, por exemplo, secretam ou expressam menos de 0,6, 0,5, 0,25 ou 0,125 do nível de expressão de Hnrph1, precursor CD44 da isoforma 2 do antígeno, Papss2 ou rpL7a expresso ou secretado por células aderentes da placenta ou tecido adiposo desenvolvidas em cultura 2D.

Durante a colocação em prática da presente invenção, os presentes inventores perceberam que as células aderentes estromais e, particularmente as 3D-ASCs, demonstraram atividade imunossupressora. Conforme mostrado no Exemplo 3 da parte de Exemplos que se segue, verificou-se que as células estromais aderentes e, especialmente as 3D-ASCs, suprimem a reação imunológica das células mononucleares do

sangue do cordão humano em um ensaio MLR. Assim, as células da presente invenção podem compreender atividades biológicas que podem ser preferencialmente utilizadas na prática clínica (por exemplo, atividade de supressão de células T, atividade de suporte de células-tronco hematopoiéticas).

Durante a colocação em prática da presente invenção, os presentes inventores perceberam que o meio condicionado das células da presente invenção pode compreender atividades biológicas que podem ser preferencialmente utilizadas na prática clínica (por exemplo, atividade de supressão de células T, atividade de suporte de células-tronco hematopoiéticas).

Portanto, a presente invenção contempla ainda a coleta de meio condicionado e seu uso como está ou em seguida a outras etapas de concentração, enriquecimento ou fracionamento, usando métodos bem conhecidos na técnica. De preferência, um meio condicionado da presente invenção é obtido a partir de uma cultura de células de médio logaritmo de alta viabilidade.

Conforme mencionado aqui acima, as células e os meios condicionados da presente invenção são caracterizados por um fenótipo de células-tronco estromais e como tais podem ser usadas em qualquer pesquisa e aplicação clínica que possa beneficiar-se do uso dessas células.

O enxerto e início da hematopoiese pelas HSCs transplantadas dependem de processos complexos que incluem adesão, depois de um gradiente de quimiocinas através da barreira celular endotelial até a medula óssea e alojamento nos nichos apropriados, enquanto são estabelecidos contatos

físicos entre as células transplantadas, a ECM e as células mesenquimais dos nichos. Todos esses processos envolvem um conjunto complexo de moléculas, tais como citocinas, hormônios, esteroides, proteínas de matriz extracelular, fatores de crescimento, interação célula-a-célula e proteínas de adesão e proteínas de matriz.

É sabido que apenas 1-5% das HSCs transfundidas são detetadas na BM do recetor 2-3 dias pós- transplante [Kerre e outros, J Immunol. 167:3692-8 (2001); Jetmore e outros, Blood. 99:1585-93(2002)].

A contribuição das MSCs para o enxerto hematopoiético é, em parte, pela inibição da produção de células T originadas no doador, as quais causam doença enxerto-hospedeiro [GvHD, Charbord P., e Moore, K., Ann. N. Y. Acad. Sei. 1044: 159-167 (2005); Maitra B. e outros, Bone Marrow Transplant. 33 (6):597-604. (2004); Patentes norte-americanas Nos. 6.010.696; 6555374]; e em parte por oferecerem um suporte de células-tronco hematopoiéticas (HSC) (i.e., sustentando e auxiliando na proliferação, maturação e/ou adesão das células-tronco hematopoiéticas).

Conforme mostrado no Exemplo 2 da parte de Exemplos que se segue, verificou-se, surpreendentemente, que as células aderentes obtidas da placenta e do tecido adiposo suportavam o enxerto de HSC mesmo depois da quimioterapia. Dados esses resultados, é concebível que células ou meios da presente invenção possam ser usados em qualquer aplicação clínica para a qual o transplante de células-tronco estromais seja utilizado.

Portanto, de acordo com um outro aspeto da presente invenção, é previsto um método para o tratamento de uma

condição médica (por exemplo, patologia, doença, síndrome) que pode beneficiar-se do transplante de células-tronco estromais em um indivíduo com essa necessidade.

Conforme aqui utilizado, o termo "tratamento" refere-se a inibir ou deter o desenvolvimento de uma patologia e/ou provocar a redução, remissão ou regressão de uma patologia. Aqueles versados na técnica compreenderão que várias metodologias e ensaios podem ser usados para avaliar o desenvolvimento de uma patologia e, de modo semelhante, várias metodologias e ensaios podem ser usados para avaliar a redução, remissão ou regressão de uma patologia. De preferência, o termo "tratamento" refere-se a aliviar ou diminuir um sintoma associado a uma doença cancerosa. De preferência, o tratamento cura, por exemplo, elimina substancialmente os sintomas associados à condição médica.

Conforme aqui utilizada, a expressão "uma condição médica que pode beneficiar-se de transplante de células-tronco estromais" refere-se a qualquer condição médica que pode ser aliviada pela ' administração de células/meios da presente invenção. Os termos ou frases "transplante", "substituição celular" ou "enxerto" são aqui utilizados um no lugar do outro e referem-se à introdução das células da presente invenção no tecido alvo.

Conforme aqui utilizado, o termo "indivíduo" refere-se a qualquer indivíduo (por exemplo, mamífero), de preferência um ser humano.

O método deste aspeto da presente invenção compreende administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficiente das células ou meios da presente invenção (descritos aqui acima), tratando desse modo a condição

médica que pode beneficiar-se do transplante de células-tronco estromais no indivíduo.

As células que podem ser administradas, de acordo com este aspeto da presente invenção, incluem as células aderentes acima descritas que podem ser submetidas à cultura em configurações bidimensionais ou tridimensionais, bem como células derivadas da mesma, mesenquimais e não mesenquimais, parcial ou terminalmente diferenciadas.

Os métodos para dar origem a células específicas de uma linhagem a partir das células-tronco estromais da presente invenção são bem conhecidas na técnica. Veja, por exemplo, as Patentes norte-americanas n.ºs 5.486.359, 5.942.225, 5.736.396, 5.908.784 e 5.902.741.

As células podem ser nativas ou geneticamente modificadas, como para dar origem a uma linhagem de interesse (veja o Pedido de Patente norte-americano N.º 20030219423).

As células e os meios podem ser de fonte autóloga ou não autóloga (i.e. alogênica ou xenogênica) de preparados frescos ou congelados (por exemplo, crio-preservados).

Dependendo da condição médica, o indivíduo pode receber drogas químicas adicionais (por exemplo, imunomoduladores, quimioterapia, etc.) ou células.

Assim, por exemplo, para melhorar o enxerto de células-tronco (por exemplo, aumentar o número de HSCs viáveis na BM do recetor e melhorar favoravelmente o número de glóbulos brancos) as células/meios da presente invenção podem ser administradas antes, concomitantemente ou depois do transplante de HSC.

De preferência, as HSCs e células-tronco estromais partilham antígenos HLA comuns. De preferência, as HSCs e células estromais são de um único indivíduo. Alternativamente, as HSCs e células estromais são de indivíduos diferentes.

Os termos ou frases "transplante", "substituição celular" ou "enxerto" são usados um no lugar do outro aqui e referem-se à introdução das células da presente invenção no tecido alvo. As células podem ser obtidas do recetor ou de um doador alogénico ou xenogénico.

Considerando que provavelmente as células não autólogas induzem uma reação imunológica quando administradas no corpo, foram desenvolvidas várias abordagens para reduzir a probabilidade de rejeição de células não autólogas. Estas incluem suprimir o sistema imunológico do recetor ou encapsular as células não autólogas em membranas imunoisolantes, semipermeáveis antes do transplante.

As técnicas de encapsulamento são geralmente classificadas como microencapsulamento envolvendo pequenos veículos esféricos e macroencapsulamento, envolvendo membranas maiores de lâmina plana e fibra oca (Uludag, H. e outros. Technology of mammalian cell encapsulation. Adv Drug Deliv Rev. 2000;42:29-64).

Métodos para preparar as microcápsulas são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, aqueles descritos por Luz MZ e outros, Cell encapsulation with alginate and alpha-phenoxy-cinnamylidene-acetylated poly (allylamine). Biotechnol Bioeng. 2000, 70:479-83, Chang TM e Prakash S. Procedures for microencapsulation of enzymes, cells and

genetically engineered microorganisms. Mol Biotechnol. 2001, 17:249-60 e Lu MZ e outros, a Novel cell encapsulation method using photosensitive poly (allylamine alpha-cyanocinnamylideneacetate). J. Microencapsul. 2000, 17:245-51.

Por exemplo, as microcápsulas são preparadas realizando a complexação de colágeno modificado com uma casca de terpolímero de 2-hidroxietil metilacrilato (HEMA), ácido metacrílico (MAA) e metacrilato de metila (MMA), resultando em uma espessura de cápsula de 2-5 μ m. Essas microcápsulas podem ser ainda encapsuladas com mais cascas de terpolímero de 2-5 μ m, a fim de proporcionar uma superfície lisa carregada negativamente e minimizar a absorção de proteína no plasma (Chia, S.M, e outros. Multi-layered microcapsules for cell encapsulation Biomaterials. 2002 23: 849-56).

Outras microcápsulas baseiam-se no alginato, um polissacarídeo marinho (Sambanis, A. Encapsulated islets in diabetes treatment. Diabetes Technol. Ther. 2003, 5:665-8) ou seus derivados. Por exemplo, as microcápsulas podem ser preparadas por complexação de polieletrólito entre os poliânions do alginato de sódio e sulfato de celulose e sódio com polycation hidrocloreto de poli(metileno-co-guanidina) na presença de cloreto de cálcio.

Será observado que o encapsulamento das células é melhorado quando são usadas cápsulas menores. Portanto, o controle de qualidade, estabilidade mecânica, propriedades de difusão e atividades in vitro das células encapsuladas melhoraram quando o tamanho da cápsula foi reduzido de 1 mm para 400 μ m (Canaple L. e outros. Improving cell encapsulation through size control. J. Biomater Sci Polym Ed.

2002;13:783-96). Além disso, verificou-se que bio cápsulas nanoporosas com tamanho de poro bem controlado, de cerca de 7 nm apenas, químicas adaptadas à superfície e microarquiteturas precisas foram bem-sucedidas em imunoisolar microambientes para células (Williams D. Small is beautiful: microparticle and nanoparticle technology in medical devices. Med. Device Technol. 1999, 10: 6-9; Desai T.A. Microfabrication technology for pancreatic cell encapsulation. Expert Opin Biol Ther. 2002, 2: 633-46).

Exemplos de agentes imunossupressores incluem, mas não se limitam a metotrexato, ciclofosfamida, ciclosporina, ciclosporina A, cloroquina, hidroxicloroquina, sulfasalazina (sulfasalazopirina), sais de ouro, D-penicilamina, leflunomida, azatioprina, anakinra, infliximabe (REMICADE), etanercepte, bloqueadores TNF. alfa, um agente biológico que inibe uma citocina inflamatória e Droga Antiinflamatória Não Esteroide (NSAIDs). Exemplos de NSAIDs incluem mas não se limitam a ácido acetilsalicílico, salicilato de magnésio colina, diflunisal, salicilato de magnésio, salsalato, salicilato de sódio, diclofenaco, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, cetoprofeno, cetorolaco, meclofenamato, naproxeno, nabumetona, fenilbutazona, piroxicam, sulindaco, tolmetina, acetaminofeno, ibuprofeno, inibidores Cox-2 e tramadol.

Em qualquer dos métodos aqui descritos, as células ou meios podem ser administrados por si ou, de preferência, como parte de uma composição farmacêutica que compreende ainda uma barreira farmacêuticamente aceitável.

Conforme aqui utilizado, o termo "composição farmacêutica" refere-se a uma preparação de um ou mais dos conjugados químicos aqui descritos, com outros componentes químicos,

tais como transportadores farmacêuticamente adequados ou excipientes. A finalidade de uma composição farmacêutica é facilitar a administração de um composto a um indivíduo.

Daqui em diante, a expressão "transportador farmacêuticamente adequado" refere-se a um transportador ou um diluente que não cause irritação importante em um indivíduo e não anule a atividade biológica e as propriedades do composto administrado. Exemplos, sem limitações, de transportadores são propileno glicol, solução salina, emulsões e misturas de solventes orgânicos com água.

Aqui o termo "excipiente" refere-se a uma substância inerte adicionada a uma composição farmacêutica para facilitar a administração de um composto. Exemplos de excipientes, sem limitação, incluem carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, vários açúcares e tipos de amido, derivados de celulose, gelatina, óleos vegetais e polietileno glicóis.

De acordo com um modo de realização preferido da presente invenção, o transportador farmacêutico é uma solução salina aquosa.

Técnicas para formulação e administração de drogas podem ser encontradas em "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edição.

Pode-se administrar a composição farmacêutica de maneira sistêmica (conforme detalhado aqui acima). Alternativamente, pode-se administrar a composição farmacêutica localmente, por exemplo, via injeção da composição farmacêutica diretamente em uma região de tecido de um paciente.

As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser fabricadas por processos bem conhecidos na técnica, como por exemplo, por meio de processos convencionais de mistura, dissolução, granulação, fabricação de drágeas, pulverização, emulsificação, encapsulamento, aprisionamento ou liofilização.

As composições farmacêuticas para uso de acordo com a presente invenção podem, portanto, ser formuladas de maneira convencional, usando um ou mais transportadores fisiologicamente aceitáveis compreendendo excipientes e auxiliares, os quais facilitam o processamento dos ingredientes ativos em preparações que podem ser usadas farmaceuticamente. A formulação adequada depende da via de administração escolhida.

Para injeção, os ingredientes ativos da composição farmacêutica podem ser formulados em soluções aquosas, de preferência em tampões fisiologicamente compatíveis, tais como solução de Hank, solução de Ringer, ou tampão de sal fisiológico. Para administração transmucosal, são usados penetrantes apropriados para a barreira a ser permeada na formulação. Esses penetrantes são geralmente conhecidos na técnica.

Para qualquer preparação usada nos métodos da invenção, a quantidade terapeuticamente eficiente ou dose pode ser estimada inicialmente a partir de ensaios in vitro e de cultura de célula. De preferência, a dose é formulada em um modelo animal para chegar a uma concentração ou titulação desejada. Essa informação pode ser usada para determinar com maior precisão a dose útil em humanos.

A toxicidade e a eficácia terapêutica dos ingredientes ativos aqui descritos podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão in vitro, em culturas de células ou animais experimentais.

Os dados obtidos a partir desses ensaios in vitro e de cultura de células e estudos animais podem ser usados na formulação de uma faixa de dosagem para uso em humanos. A dosagem pode variar dependendo da forma de dosagem empregada e da via de administração utilizada. A formulação exata, via de administração e dosagem podem ser escolhidas pelo médico individual tendo em vista o quadro apresentado pelo paciente (veja por exemplo, Fingi e outros, 1975 em "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p. 1). Por exemplo, o paciente portador de Parkinson pode ser monitorado sintomaticamente em relação à melhora das funções motoras, indicando resposta positiva ao tratamento.

Para injeção, os ingredientes ativos da composição farmacêutica podem ser formulados em soluções aquosas, de preferência em tampões fisiologicamente compatíveis, tais como solução de Hank, solução de Ringer ou tampão de sal fisiológico.

A quantidade e intervalo da dosagem podem ser ajustados individualmente de acordo com os níveis do ingrediente ativo que são suficientes para regular efetivamente a síntese do neurotransmissor pelas células implantadas. As dosagens necessárias para atingir o efeito desejado dependem de características individuais e da via de administração. Ensaios de detecção podem ser usados para determinar concentrações no plasma.

Dependendo da gravidade e da resposta da condição a ser

tratada, a dose pode ser por administração única ou uma pluralidade de administrações, com a duração do tratamento indo desde vários dias até várias semanas ou até ser obtida diminuição do quadro da doença.

A quantidade de uma composição a ser administrada, naturalmente, vai depender do indivíduo que está sendo tratado, da gravidade da doença, do modo de administração, do discernimento do médico responsável pela prescrição, etc. A dosagem e o tempo de administração serão correspondentes a uma monitorização cuidadoso e contínuo da alteração da condição individual. Por exemplo, um paciente tratado para Parkinson receberá uma quantidade de células que é suficiente para aliviar os sintomas da doença com base nas indicações da monitorização.

Em seguida ao transplante, as células da presente invenção sobrevivem, de preferência, na área doente por um período de tempo (por exemplo, pelo menos 6 meses), de modo que seja observado um efeito terapêutico.

As composições incluindo a preparação da presente invenção formuladas em um transportador farmacêutico compatível também podem ser preparadas, colocadas em um recipiente apropriado e rotuladas para tratamento de uma condição indicada.

As composições da presente invenção podem, se desejado, ser apresentadas em uma embalagem ou dispositivo de aplicação, como por exemplo, um kit aprovado pelo FDA, o qual pode conter uma ou mais formas de dosagem unitária contendo o ingrediente ativo. A embalagem pode, por exemplo, compreender folha metálica ou plástica, como por exemplo, a embalagem tipo blister. A embalagem ou dispositivo de

aplicação pode ser acompanhado de instruções para a administração. A embalagem ou aplicador também pode ser acompanhado de um aviso associado ao recipiente na forma prescrita por uma agência governamental reguladora da fabricação, uso ou venda de produtos farmacêuticos, cujo aviso reflete a aprovação da agência para a forma das composições ou administração humana ou veterinária. Esse aviso, por exemplo, pode ser um rótulo aprovado pela U.S. Food and Drug Administration (Agência Governamental Norte-americana que regula alimentos e Medicamentos) para drogas que necessitam de prescrição, ou um encarte aprovado para o produto.

EXEMPLOS

Agora é feita referência aos seguintes exemplos, os quais juntamente com as descrições acima, ilustram a invenção de maneira não limitadora.

Geralmente, a nomenclatura aqui utilizada e os procedimentos laboratoriais usados na presente invenção incluem técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas, de DNA and recombinante. Essas técnicas são explicadas completamente na literatura. Veja, por exemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook e outros (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I- III Ausubel, R.M., Ed. (1994); Ausubel e outros, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson e outros, "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren e outros (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring harbor Laboratory press, New York (1998); metodologias definidas

nas Patentes norte-americanas N°s 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 e 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J.E., ed (1994); "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites e outros (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8a. Edição), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); os imunoensaios disponíveis são amplamente descritos na patente e literatura científica, veja, por exemplo, Patentes norte-americanas n°s 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 e 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., Ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames B. D., e Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B.D. e Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) e "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols; A Guide to Methods and Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak e outros, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); aqui indicado. Outras referências gerais são providenciadas ao longo do documento. Todos eles aqui incorporados por referência como se integralmente mencionados.. Acredita-se que os procedimentos neles contidos sejam bem conhecidos na técnica e são fornecidos para conveniência do leitor. Todas as informações nelas contidas são aqui incorporadas por referência.

EXEMPLO 1

Produção e cultura de células estromais aderentes (ASC) da medula óssea, placenta e tecidos adiposos

As células aderentes foram submetidas à cultura em um sistema de biorreator contendo transportadores 3D para produzir células 3D-ASC, caracterizadas por um perfil específico de expressão do marcador de célula. A eficiência de crescimento foi testada através da contagem de células. A capacidade de diferenciação dessas células foi testada por cultura em um meio de diferenciação.

MATERIAIS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Células estromais da medula óssea - As células estromais da medula óssea (BM) foram obtidas por aspiração da medula no esterno de doadores hematologicamente saudáveis que se submeteram a cirurgia de coração aberto ou biópsia de BM. Os produtos aspirados da medula foram diluídos 3 vezes em Solução Salina Balanceada de Hank (HBSS; GIBCO BRL/Invitrogen, Gaithersburg MD) e submetidos à centrifugação de gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Robbins Scientific Corp. Sunnyvale, CA). Depois, as células mononucleares da medula ($<1,077$ gm/cm³) foram coletadas, lavadas 3 vezes em HBSS e recolocadas em suspensão no meio de crescimento [DMEM (Biological Industries, Beit Ha'Emek, Israel) suplementado com 10% de FCS (GIBCO BRL), 10^{-4} M mercaptoetanol (Merck, White House Station, NJ), mistura de Pen-Strep-Nystatin (100 U/ml: 100 ug/ml: 1,25 um/ml; Beit Ha'Emek), 2 mM de L-glutamina (Beit Ha'Emek); As células dos doadores individuais foram incubadas separadamente em frascos de cultura de tecido (Corning, Acton, MA) a 37°C (5% de CO₂) com troca semanal dos meios de cultura. As células foram divididas a cada 3-4

dias usando 0,25% de tripsina-EDTA (Beit Ha'Emek). Depois de 2-40 passagens, ao atingir 60-80% de confluência, as células foram coletadas para análise ou para cultura em biorreatores.

Células estromais obtidas da placenta - As partes internas de uma placenta de parto a termo (Bnei Zion Medical Center, Haifa, Israel) foram cortadas sob condições esterilizadas, lavadas 3 vezes com Tampão de Hank e incubadas por 3 horas a 37°C com 0, 1% de Colagenase (1mg/ml de tecido; Sigma-Aldrich, St. Lewis, MO). Usando transferência suave por pipeta, as células suspensas foram então lavadas com DMEM suplementado com 10% de FCS, mistura de Pen-Strep-Nystatin (100 U/ml:100 ug/ml: 1,25 un/ml) e 2 mM de L-glutamina, fertilizadas em frascos de 75 cm² e incubadas a 37°C em uma incubadora de cultura de tecido sob condição umidificada com 5% de CO₂. Depois, permitiu-se que as células aderissem a uma superfície plástica durante 72 horas após o que os meios foram trocados a cada 3-4 dias. Ao chegar a 60-80% de confluência (geralmente 10-12 dias), as células foram destacadas do frasco de crescimento usando 0,25% de tripsina-EDTA e fertilizadas em novos frascos. As células da cultura foram depois coletadas para análise ou para cultura em biorreatores.

Células estromais obtidas de tecido adiposo - As células estromais foram obtidas de tecido adiposo humano por procedimentos de lipossucção (Rambam Haifa, Israel). O tecido adiposo foi lavado intensamente com volumes iguais de PBS e digerido a 37°C durante 30 minutos com colagenase (20 mg/ml). As células foram então lavadas com DMEM contendo 10% de FCS, mistura de Pen-Strep-Nystatin (100 U/ml:100 ug/ml: 1,25 un/ml) e L-Glutamina e centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos RT, colocadas novamente em

suspensão com solução para lise (1:10; Biological Industries, Beit Ha'emek, Israel, a fim de descartar os glóbulos vermelhos do sangue), centrifugadas e novamente colocadas em suspensão com DMEM contendo 10% de FCS, mistura de Pen-Strep-Nystatin (100 U/ml:100 ug/ml: 1,25 un/ml) e L-Glutamina. As células lavadas foram então fertilizadas em um frasco de meio de cultura de tecido esterilizado a $3-10 \times 10^7$ células/frasco. Nos dias que se seguiram, as células foram lavadas com PBS para remover RBC residual e células mortas. As células foram mantidas a 37°C em uma incubadora de cultura de tecido sob condição umidificada com 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada 3-4 dias. Com 60-80% de confluência, as células foram destacadas do frasco de crescimento usando 0,25% de tripsina-EDTA e fertilizadas em novos frascos. Depois de 2-40 passagens, quando as células chegaram a 60-80% de confluência, as células foram coletadas para análise ou para cultura em biorreatores.

Biorreator de Fluxo constante PluriX™ - O biorreator de fluxo constante PluriX™ (Pluristem, Haifa, Israel; conforme ilustrado na Figura 1g, veja também a Patente norte-americana N° 6.911.201) foi carregado com 1-100 ml de transportadores porosos 3D embalados (4 mm de diâmetro) feitos de uma matriz de tecido não trançado de poliéster. Esses transportadores possibilitam a propagação de grandes números de células em um volume relativamente pequeno. Os objetos de vidro foram desenhados e fabricados pela Pluristem. O biorreator foi mantido em uma incubadora a 37°C com velocidade de vazão regulada e monitorada por uma válvula (6a na Figura 1g) e bomba peristáltica (9 na Figura 1g). O biorreator contém um ponto de amostragem e injeção (4 na Figura 1g), permitindo a fertilização sequencial das células. O meio de cultura foi fornecido com pH de 6,7-7,4

a partir de um reservatório (1 na Figura 1g). O reservatório foi abastecido com uma mistura de gás filtrado (2,3 na Figura 1g) contendo ar/C02/02 em proporções diferentes, dependendo da densidade das células no biorreator. A proporção de 02 era adequada ao nível de 02 dissolvido na saída do biorreator, determinado por um monitor (6 na Figura 1g). A mistura de gás foi fornecida ao reservatório via tubos de silicone ou difusor (Degania Bet, Emek Hayarden, Israel). O meio de cultura foi passado por um recipiente separador (7 na Figura 1g) que possibilita a coleta de células circulantes, não aderentes. A circulação do meio foi obtida por uma bomba peristáltica (9 na Figura 1g). O biorreator era ainda equipado com um ponto de amostragem adicional (10 na Figura 1g) e recipientes para troca contínua de meio.

Produção de células estromais aderentes 3D (3D-ASC) - Culturas de células 2D aderentes, humanas, primárias, não confluentes, desenvolvidas conforme acima descrito, foram lavadas com tripsina, novamente colocadas em suspensão em DMEM suplementadas com 10% de FBS, mistura de Pen-Strep-Nystatin (100 U/ml:100 ug/ml: 1,25 un/ml) e 2 mM de L-glutamina e fertilizadas (103-105 células/ml) via um ponto de injeção nos transportadores 3D em um biorreator de fluxo constante estéril (veja. a Figura 1g). Antes da inoculação, o biorreator foi enchido com PBS- ca-Mg (Biological Industries, Beit Ha'emek, Israel), colocado em autoclave (120°C, 30 min.) e lavado com meio de crescimento de Dulbecco contendo 10% de soro fetal de bezerro e uma mistura de Pen-Strep-Nystatin (100 U/ml:100 ug/ml: 1,25 un/ml). O fluxo foi mantido a uma velocidade de 0,1-5 ml/min. O processo de fertilização envolveu a paralisação da circulação durante 2-48 horas, permitindo com isso que as células sedimentassem nos transportadores. O biorreator

foi mantido em condições controladas de temperatura (37°C) e pH (pH = 6,7-7,4); usando uma incubadora abastecida de ar esterilizado e CO₂ conforme necessário. O meio de crescimento foi substituído 2-3 vezes por semana. O meio de circulação foi substituído por meios frescos DME a cada 4 horas até 7 dias. A uma densidade de 1×10^6 – 1×10^7 células/ml (depois de 12-40 dias de crescimento), o volume total do meio foi removido do biorreator e o biorreator e transportadores foram lavados 3- 5 vezes com PBS. As células 3D-ASC foram então destacadas dos transportadores com Tripsina-EDTA; (Biological Industries, Beit Ha'emek, Israel; 3-15 minutos com agitação suave, 1-5 vezes) e foram depois novamente colocadas em suspensão em DMEM e crio-preservadas.

Ensaio biológico de qualidade 3D-ASC - As células 3D-ASC crio-preservadas foram descongeladas e contadas. Para avaliação da viabilidade celular, foram fertilizadas 2×10^5 células em um frasco de cultura de tecido de 150 cm² e sua capacidade de aderência e re-população foi avaliada dentro de 7 dias depois da fertilização. Depois, o fenótipo do marcador de membrana 3D- ASC foi analisado usando citômetro de fluxo de anticorpos monoclonais por fluorescência (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

Comparação entre o perfil do marcador de membrana celular de células aderentes de cultura 3D e 2D usando ensaios de citometria de fluxo - 100.000- 200.000 células aderentes de culturas 2D e culturas de sistema de fluxo 3D foram suspensas em 0, 1 ml de meio de cultura em um tubo de 5 ml e incubadas (4°C, 30 minutos, condições escuras) com concentrações de saturação de cada um dos seguintes MAbs: CD90 anti-humano FITC conjugado (Chemicon International Inc. Temecula, CA), CD73 anti-humano PE conjugado (Bactlab

Diagnostic, Ceasarea, Israel), CD105 anti-humano PE conjugado (eBioscience, San Diego, CA), CD29 anti-humano FITC conjugado (eBioscience, San Diego, CA), CD46 anti-humano Cy7-PE conjugado (eBioscience), CD19 anti-humano PE conjugado (IQProducts, Groningen, Holanda), CD14 MAb anti-humano PE conjugado (IQProducts), CD11b0 anti-humano FITC-conjugado (IQProducts) e CD34 anti-humano PE conjugado (IQProducts) ou com H1A-DR MAb anti-humano FITC conjugado (IQProducts). Depois da incubação, as células foram lavadas duas vezes em PBS gelado contendo 1% de FCS tornado inativo por calor, novamente colocadas em suspensão em 500 μ de formaldeído 0, 5% e analisadas usando o citômetro de fluxo FC-500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

Comparação entre o perfil de proteína de células aderentes de cultura 3D e 2D usando análise de espectrometria em massa

- foram produzidas ASCs por procedimentos de culturas 2D e 3D a partir da placenta, conforme descrito acima. Resumidamente, as culturas 2D foram produzidas pela cultura de células $0,3-0,75 \times 10^6$ em frascos de 175 cm² durante 4 dias em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C até atingir 60-80% de confluência. As culturas 3D foram produzidas fertilizando $2-10 \times 10^6$ células/grama em um biorreator contendo 200 transportadores e realizando a cultura durante 18 dias. Depois da extração, as células foram lavadas (3 vezes) para remover todo soro, granulado e congelado. As proteínas foram isoladas dos grânulos [usando o kit Tri-Reagente (Sigma, Saint Louis, EUA) e digeridas com tripsina e rotuladas com reagente iTRAQ (Applied Biosciences, Foster City, CA)], de acordo com o protocolo dos fabricantes. Resumidamente, os reagentes iTRAQ são reagentes traçadores isobáricos não poliméricos. Os peptídeos dentro de cada amostra são rotulados com um de quatro tags isobáricos codificados por isótopo via suas

cadeias terminais N e/ou laterais de lisina. As quatro amostras rotuladas são misturadas e os peptídeos analisados por espectrometria em massa. Depois da fragmentação dos peptídeos, cada tag libera um íon repórter de massa distinto; a relação dos quatro repórteres dá, portanto, abundâncias relativas do peptídeo dado em uma amostra (informações no: <http://does.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/0113379.pdf>).

A análise proteômica da cultura 2D contra cultura 3D das ASCs obtidas da placenta foi realizada no centro proteômico Smoler (departamento de biologia, Technion, Haifa, Israel) usando LC-MS/MS em QTOF- Premier (Waters, San Francisco, CA) com identificação e análise feitas pelo software Pep-Miner [Beer, I. e outros, *Proteomics*, 4, 950-60 (2004)] contra a parte humana da base de dados nr. As proteínas analisadas foram: ribonucleoproteína nuclear heterogênea H1 (Hnrph 1 GeneBank Acesso N° NP_005511), família da histona H2A (HEAF., GeneBank Acesso N° NP_034566.1), fator de alongamento eucariótico de translação 2 (EEEF2, GeneBank Acesso N° NP_031933.1), reticulocalbina 3, domínio fixador de cálcio EF-hand (RCN2, GeneBank Acesso N° NP_065701), precursor CD44 da isoforma 2 do antígeno (GeneBank Acesso N° NP_001001389, músculo liso, básico, calponina 1 (CNN1, GeneBank Acesso N° NP_001290), 3 fosfoadenosina, sintase de fosfossulfato 2 isoforma a (Papss2, GeneBank Acesso N° NP_004661), proteína ribossômica L7a (rpL7a, GeneBank Acesso N° NP_000963) e Aldeído desidrogenase X (ALDH X, GeneBank Acesso N° P47738). Cada experimento foi feito duas vezes. Por causa da natureza da análise, cada proteína foi analisada de acordo com o número de peptídeos que apareceram em uma amostra (2-20 aparecimentos de uma proteína em cada análise).

Comparação entre proteínas secretadas em células aderentes de cultura 3D e 2D usando ELISA

– ASCs de procedimentos de cultura 2D e 3D produzidas a partir da placenta, foram produzidas conforme acima descrito, com culturas 3D pela duração de 24 dias. Depois, foram coletados e analisados os meios condicionados para o ligante Flt-3, IL-6, Trombopoietina (TPO) e fator de célula-tronco (SCF), usando ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN), em três experimentos independentes. Os resultados foram normalizados para 1×10^6 células/ml.

Meios diferenciadores de osteoblasto

– A diferenciação osteogênica foi avaliada por cultura de células em um meio diferenciador de osteoblasto consistindo de DMEM suplementado com 10% de FCS, 100 nM de dexametasona, 0,05 mM de ácido ascórbico 2-fosfato, 10 mM de B-glicerofosfato por um período de 3 semanas. A matriz calcificada foi indicada pela coloração com Vermelho S Alizarin e a fosfatase alcalina foi detetada pelo kit de teste para fosfatase alcalina (todos os reagentes da Sigma-Aldrich, St. Lewis, MO).

RESULTADOS

O Sistema Biorreator PluriX™ cria um microambiente tipo fisiológico.

A fim de produzir condições de cultura eficientes para as células aderentes, foi criado artificialmente um ambiente tipo fisiológico (ilustrado na Figura 1a), usando o biorreator PluriX (Pluristem, Haifa, Israel; transportador ilustrado na Figura 1g e mostrado antes da fertilização na Figura 1b). Conforme mostrado nas Figuras 1c-f, as células 3D-ASC produzidas pela medula óssea foram submetidas à

cultura com sucesso e expandidas na matriz 3D, 20 dias (Figuras 1b-c, ampliadas 150 e 250 vezes, respectivamente) e 40 dias (Figuras 1c-d, ampliadas 350 e 500 vezes, respectivamente).

Células cultivadas no sistema Biorreator PluriX foram significativamente expandidas - Foram desenvolvidos lotes diferentes de produção de células 3D-ASC obtidas da placenta nos sistemas do biorreator PluriX. A densidade de fertilização foi de 13.300 células/transportador (até um total de 2×10^6 células). Catorze dias depois da sedimentação, a densidade celular multiplicou 15 vezes, chegando a aproximadamente 200.000 células/transportador (Figura 2) ou 30×10^6 em um biorreator à densidade de $1,5 \times 10^4$ células/ml e 30 dias depois da fertilização os transportadores continham um número de células 50 vezes maior, i.e. aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células/transportador, ou $0,5 \times 10^7$ células/ml. A densidade celular nos transportadores nos vários níveis da coluna de desenvolvimento era consistente, indicando uma transferência homogênea de oxigênio e nutrientes para as células. O sistema de cultura 3D provou, portanto, que oferece condições de suporte para o desenvolvimento e manutenção prolongada de culturas de células mesenquimais de alta densidade, as quais podem ser desenvolvidas eficientemente até uma quantidade suficiente com a finalidade de suportar o enxerto e transplante bem-sucedido.

3D-ASCs mostram características únicas de marcador de membrana - A fim de estabelecer a diferença do perfil de secreção de moléculas solúveis e produção de proteínas, efetuada pelo procedimento de cultura 3D que imita o ambiente ósseo, foi realizada a análise FACs. Conforme

mostrado na Figura 3a, a análise FACS dos marcadores de célula ilustra que as 3D-ASCs exibem um padrão de expressão de marcador diferente do que as células aderentes desenvolvidas em condições 2D. As células de cultura 2D expressaram níveis significativamente maiores de marcadores de membrana positiva CD90, CD105, CD73 e CD29 em comparação às células de cultura 3D. Por exemplo, CD105 mostrou uma expressão de 56% em células de cultura 3D contra 87% em células de cultura 2D. ASCs de ambas as culturas de placenta 2D e 3D não expressaram nenhum marcador de membrana hematopoiético (Figura 3b).

3D-ASCs mostram um perfil único de fatores solúveis - O nicho hematopoiético inclui células de suporte que produzem uma abundância de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. A fim de definir mais a diferença entre as ASCs de cultura 2D e 3D, o perfil das quatro principais proteínas hematopoiéticas secretadas nos meios condicionados de culturas de ASC 2D e 3D foi obtido por ELISA. As Figuras 4a-c mostram que o desenvolvimento das células em condições 3D produziu meio condicionado com níveis maiores de ligante Flt-3 (Figura 4a), IL-6 (Figura 4b) e SCF (Figura 4c), enquanto foram detectados níveis baixos de IL-6 e nível de ligante Flt-3 próximo de zero nos meios condicionados das culturas 2D. A Produção de Trombopoietina (TPO) foi muito baixa e igual em ambas as culturas.

3D-ASCs mostram um perfil único de proteína na análise de espectrometria em massa - A fim de estabelecer mais a diferença entre as ASCs de cultura 2D e 3D, o perfil de proteína dessas células foi analisado por espectrometria em massa. A Figura 4d mostra que as ASCs de cultura 2D e 3D demonstram um perfil de expressão de proteína notavelmente

diferente. Conforme mostrado na Tabela abaixo, as células de cultura 3D mostram um nível de expressão muito maior de H2AF e ALDH X (mais de 9 e 12 vezes maior, respectivamente) e um nível maior das proteínas EEEF2, RCN2 e CNN1 (cerca de 3, 2,5 e 2 vezes, respectivamente). Além disso, as células de cultura 3D mostram cerca de metade dos níveis de expressão das proteínas Hnrph1 e precursor CD44 da isoforma 2 do antígeno e cerca de um terço dos níveis de expressão de Papss2 e rpL7a.

Tabela 1

Proteína	Nível de proteína (em relação ao grupo repórter)			
	ASCs de cultura 3D		ASCs de cultura 2D	
	Av	SD	Av	SD
Hnrph1	1,434493	0,260914	0,684687	0,197928
H2AF	0,203687	0,288058	1,999877	0,965915
EEEF2	0,2563409	0,130064	0,799276	0,243066
RCN2	0,54	0,25	1,34	0,26
Precursor CD44 da isoforma 2 do antígeno	1,68	0,19	0,73	0,17
CNN1	0,77	0,15	1,55	0,17
Papss2	1,48352	0,314467	0,45627	0,137353
rpL7a	1,22	0,24	0,43	0,05
ALDH X	0,15847	0,22411	1,986711	0,212951

3D-ASCs têm a capacidade de diferenciar em osteoblastos - A fim de caracterizar mais as 3D-ASCs, as células foram submetidas à cultura em um meio diferenciador de osteoblasto por um período de 3 semanas.

Depois, foi realizada precipitação de cálcio. As células diferenciadas mostraram que produzem cálcio (ilustrado em vermelho nas Figuras 5a-b), enquanto as células de controle mantiveram um fenótipo tipo fibroblasto e não demonstraram mineralização (Figuras 5c-d). Esses resultados mostram que 3D-ASCs obtidas da placenta têm a capacidade de diferenciar in vitro em células de osteoblastos.

EXEMPLO 2

Avaliação da Capacidade das 3D-ASCs obtidas da placenta de melhorar o enxerto HSC

O suporte 3D-ASC do enxerto HSC foi avaliado pelo nível de células hematopoiéticas humanas (hCD45+) detetadas em ratinhos NOD-SCID imunodeficientes previamente tratados com quimioterapia ou expostos letalmente a radiação.

MATERIAIS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Isolamento de CD34+ Células Amostras de sangue do cordão umbilical foram retiradas sob condições estéreis durante o parto (Bnei Zion Medical Center, Haifa, Israel) e as células mononucleares foram fracionadas usando o Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Noruega), com configuração de gradiente de densidade e foram crio-preservadas. As células mononucleares descongeladas foram lavadas e incubadas com anticorpos anti-CD34 e isoladas usando midi MACS (Miltenyl Biotech, Bergish Gladbach, Alemanha). Células de mais de uma amostra foram reunidas para atingir a quantidade desejada (50.000-100.000 células).

Deteção de células transplantadas em ratinhos expostos a radiação - Ratinhos NOD-SCID macho e fêmea com sete semanas de idade (NOD-CB17-Prkdcscid/J; Harlan/ Weizmann Inst., Rehovot Israel) foram mantidos em gaiolas de sistema aberto esterilizadas, receberam dietas estéreis e água ácida purificada por autoclave. Os ratinhos foram sub- letalmente expostos a radiação (350 cGy) e depois (48 horas pós-irradiação) transplantados com 50.000-100.000 células hCD34+' com ou sem ASCs adicionais ($0,5 \times 10^6$ - 1×10^6) obtidas da placenta ou tecido adiposo (3-7 ratinhos em cada

grupo), por injeção intravenosa em uma veia lateral do rabo. Quatro a seis semanas depois do transplante os ratinhos foram sacrificados por deslocamento e a BM coletada lavando o fêmur e a tíbia dos animais com tampão FACS (50 ml PBS, 5 ml FBS, 0,5 ml de sódio azid 5%). Foram detetadas células humanas na BM dos ratinhos por citometria de fluxo e a percentagem das células de expressão do marcador de células hematopoiéticas CD45 humana e murina nos ratinhos NOD-SCID tratados foi calculada incubando as células com CD45-FITC anti-humano (IQ Products, Groningen, Holanda). O limite mais baixo para enxerto humano inequívoco foi designado em 0,5%.

Detecção de células transplantadas em ratinhos tratados com quimioterapia - ratinhos NOD-SCID, machos, com 6,5 semanas de idade (NOD.CB17/JhkiHsd-scid; Harlan, Rehovot Israel), mantidos conforme descrito aqui acima para os ratinhos expostos a radiação, foram injetados intraperitonealmente com Bussulfano (25 mg/kg durante 2 dias consecutivos). Dois dias depois da segunda injeção de Bussulfano, os ratinhos foram injetados com células CD34+ isoladamente, ou juntamente com $0,5 \times 10^6$ ASCs produzidas a partir da placenta. Três semanas e meia após o transplante, os ratinhos foram sacrificados e foi determinada a presença de células hematopoiéticas humanas, conforme descrito aqui acima, para os ratinhos expostos a radiação.

RESULTADOS

3D-ASC melhoraram o enxerto de HSC em ratinhos expostos a radiação - Células hematopoiéticas humanas CD34+ e 3D-ASC obtidas da placenta ou tecido adiposo foram co-transplantadas em ratinhos NOD-SCID expostos a radiação. A eficiência do enxerto foi avaliada 4 semanas depois do co-

transplante e comparada aos ratinhos transplantados com HSC isoladamente. Conforme mostrado na Tabela 2 e Figura 6, o co-transplante de 3D-ASC e células UCB CD34+ resultou em taxas consideravelmente mais elevadas de enxerto e níveis mais altos de células humanas na BM dos ratinhos recetores comparados aos ratinhos tratados com células UCB CD34+ isoladamente.

Tabela 2

Células transplantadas	Média de h-CD45	STDEV
CD34	3, 8	7, 9
CD34+ <u>3D-ASC</u> da placenta	5, 1	12, 2
CD34+ <u>3D-ASC</u> do tecido adiposo	8, 7	9, 6

3D-ASC melhoraram o enxerto de HSC em ratinhos tratados com quimioterapia - Células hematopoiéticas humanas CD34+ foram co-transplantadas com 500.000- 2D-ASC ou 3D-ASC obtidas da placenta em ratinhos NOD-SCID previamente tratados com quimioterapia. A eficiência do enxerto foi avaliada 3,5 semanas depois do co- transplante e comparada aos ratinhos transplantados com HSC isoladamente. Conforme mostrado na Tabela 3, o co- transplante de ASC e células UCB CD34+ resultou em níveis maiores de enxerto na BM dos ratinhos recetores em comparação às células UCB CD34+ isoladamente. Além disso, como mostrado na Tabela 3, o nível médio de enxerto foi maior em ratinhos co-transplantados com células aderentes obtidas da placenta desenvolvidas no sistema biorreator PluriX (3D-ASC) do que no co-transplante de ratinhos com células do mesmo doador, desenvolvidas em condições de cultura 2D estática convencionais (frasco).

Tabela 3

Células transplantadas	Média de h-CD45	STDEV
CD34	0,9	1, 1
CD34+ culturas 2D convencionais da placenta	3,5	0,2
CD34+3D-ASC da placenta	6, 0	7, 9

Os resultados da análise FACS mostrados nas Figuras 7a-b demonstram a vantagem de co- transplantar ASC com hHSCs (Figura 7b) e a capacidade de ASC de melhorar a recuperação do sistema hematopoiético após o transplante HSC.

Tomados em conjunto, esses resultados mostram que as ASCs podem servir como células de suporte para melhorar a recuperação hematopoiética após o transplante de HSCs (autólogas ou alogénicas). A capacidade de as 3D-ASCs melhorarem o enxerto de células-tronco hematopoiéticas e/ou progenitoras após o transplante de HSCs pode resultar da capacidade de as 3D-ASC secretarem citocinas de suporte HSC que podem melhorar a adesão, a capacidade de auto-renovação e proliferação das células transplantadas, ou da capacidade dessas células reconstruírem o microambiente hematopoiético danificado, o que é necessário para a adesão e proliferação das HSCs transplantáveis.

EXEMPLO 3

A supressão da resposta do linfócito por ASCs de cultura 2D e 3D

Verificou-se que as células estromais aderentes e, particularmente 3D-ASCs, suprimem a reação imunológica de células mononucleares do sangue do cordão humano em um ensaio MLR.

MATERIAIS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Ensaio de reação de linfócitos mistos (MLR) - As propriedades imunossupressoras e imunoprivilegiadas de procedimentos de cultura 2D e 3D, as ASCs produzidas da placenta, foram verificadas pelo ensaio MLR, o qual mede a histocompatibilidade no local HLA, conforme efetuado pela taxa de proliferação de linfócitos incompatíveis na cultura misturada de células responsivas (de proliferação) e estimulantes (não proliferativas). Foram usadas células mononucleares do sangue de cordão (CB) humano (2×10^5) e foram estimuladas por meio da co-cultura com iguais quantidades (10^5) dos monócitos obtidos do sangue periférico humano (3000Rad) expostos a radiação (PBMc) ou com células aderentes de cultura 2D ou 3D produzidas a partir da placenta, ou uma combinação de células aderentes e PBMcs. Cada ensaio foi replicado três vezes. As células foram submetidas à co-cultura durante 4 dias em meio RPMI 1640 (contendo 20% FBS em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C), em uma placa com 96 furos. As placas foram submetidas à vibração com 1μC ³H-timidina durante as últimas 18 horas de cultura. As células foram então coletadas em filtro de fibra de vidro e a absorção de timidina foi quantificada com um contador de cintilação.

RESULTADOS

A Figura 8 mostra a resposta imunológica das células CB conforme representado pela proliferação elevada dessas células quando estimuladas com PBMcs, o que, sem ser garantido pela teoria, está provavelmente associado à proliferação de células T em resposta à incompatibilidade HLA. Contudo, um nível consideravelmente menor de resposta

imunológica foi demonstrado por essas células quando incubadas com as células aderentes da presente invenção. Além disso, a resposta imunológica CB para PBMCs foi substancialmente reduzida quando co-incubadas com essas células aderentes. Assim, de maneira semelhante às MSCs, verificou-se que as ASCs têm a capacidade potencial de reduzir a proliferação de células T das células do doador, típica de GvHD. Embora ambas as culturas, 2D e 3D, tenham reduzido a resposta imunológica dos linfócitos e, em linha com as outras vantagens das 3D-ASCs descritas aqui acima, as 3D ASCs foram mais imunossupressoras.

Observa-se que certas características da invenção, as quais, para fins de clareza, são descritas no contexto dos modos de realização separados, também podem ser previstas em combinação em um modo de realização único. Inversamente, várias características da invenção, as quais, para fins de concisão, são descritas no contexto de um modo de realização único, também podem ser previstas separadamente ou em qualquer sub-combinação adequada.

Embora a invenção tenha sido descrita em conjunto com modos de realização específicos da mesma, é claro que muitas alternativas, modificações e variações se tornarão evidentes para os técnicos no assunto. Além disso, a menção ou identificação de qualquer referência neste pedido não deverá ser interpretada como uma admissão de que essa referência está disponível como anterioridade à presente invenção.

Tendo em conta o que precede, faz-se observar que a descrição também engloba os seguintes itens:

1. Um método de expansão de células, o método compreendendo

a cultura de células aderentes a partir de placenta ou tecido adiposo sob condições de cultura tridimensionais, que suportam a expansão das células.

2. Um método de produção de um meio condicionado, o método compreende

(a) cultura de células aderentes a partir de uma placenta ou do tecido adiposo em condições de cultura tridimensionais o que permite a expansão das células; e

(b) recolha de um meio condicionado das referidos células aderentes expandidas, produzindo, assim, o meio condicionado.

3. Uma população de células gerada de acordo com o método do item 1.

4. Uma população isolada de células compreendendo células aderentes da placenta ou do tecido adiposo, em que as referidas células aderentes segregam um nível mais elevado de pelo menos um factor selecionado de entre o grupo que consiste em SCF, IL-6, e Flt-3 que isso secretado pelas células aderentes de placenta ou tecido adiposo cultivadas numa cultura 2D.

5. Uma população isolada de células compreendendo células aderentes da placenta ou do tecido adiposo, em que as referidas células aderentes expressam um nível mais elevado de pelo menos uma proteína selecionada a partir do grupo que consiste na família histona H2A (H2AF), A aldeído desidrogenase X (X ALDH), tradução eucariótica fator de alongamento 2 (EEEF2), reticulocalbin 3, EF-posse domínio de ligação de cálcio (RCN2) e calponina 1 músculo liso de

base (CNN1) que a expressa por células aderentes da placenta ou do tecido adiposo cultivado numa cultura 2D.

6. Uma população isolada de células compreendendo células aderentes da placenta ou do tecido adiposo, em que o dito células aderentes expressam um nível mais baixo de expressão de pelo menos uma proteína selecionada a partir do grupo que consiste em heterogênea H1 ribonucleoproteína nuclear (Hnrph1), CD44 antígeno isoforma 2 precursor, 3 fosfoadenosina 5 fosfossulfato 2 uma isoforma da sintase (Papss2) e proteína ribossomal L7A (rpL7a) que a expressa pelas células aderentes de placenta ou tecido adiposo cultivado numa cultura 2D.

7. Uma população isolada de células compreendendo células aderentes da placenta ou do tecido adiposo, em que as referidas células aderentes são caracterizadas por uma atividade imunossupressora superior do que a de células aderentes da placenta ou adiposo tecido cultivado numa cultura 2D.

8. A população isolada de células do ponto 7, em que a referida atividade imunossupressora compreende a redução de proliferação de células T.

9. Uma composição farmacêutica compreendendo, como um ingrediente ativo, a população de células gerada de acordo o item 1.

10. Uma composição farmacêutica compreendendo, como um ingrediente ativo, o meio condicionado produzido de acordo com o item 2.

11. Uma composição farmacêutica compreendendo, como um

ingrediente ativo, a população isolada de células de item 4, 5, 6 ou 7.

12. Um método de tratamento de uma condição que pode beneficiar do transplante das células do estroma, num sujeito com necessidade do mesmo, o método compreendendo a administração ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficaz de células aderentes de um tecido selecionado a partir do grupo que consiste em placenta e no tecido adiposo, tratando assim a condição que pode beneficiar de transplante de células tronco no sujeito.

13. Um método de tratamento de uma condição que pode beneficiar do transplante das células do estroma, num sujeito com necessidade do mesmo, o método compreendendo a administração ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um meio condicionado de células aderentes derivadas de um tecido selecionado de entre o grupo que consiste em placenta e no tecido adiposo, assim tratar a condição que pode beneficiar de transplante de células tronco no assunto.

14. Um método de redução de uma resposta imunitária num sujeito que dele necessite, compreendendo o método administrar ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficaz da população isolada de células do ponto 3, 4, 5, 6 ou 7, de modo a reduzir a resposta imune no sujeito.

15. O processo do item 14, em que o sujeito é tratado com a terapia celular.

16. O processo do item 12 ou 13, que compreende ainda a administração de células-tronco.

17. O processo do item 16, em que as referidas células

estaminais compreendem células estaminais hematopoiéticas.

18. O processo do item 16, em que as referidas células estaminais são administrados concomitantemente com o referido meio condicionado ou células aderentes.

19. O processo do item 16, em que as referidas células estaminais são administradas após a administração do referido condicionado células aderentes ou forma.

20. O método dos elementos 12 e 13, em que as referidas células aderentes são obtidas a partir de uma cultura tridimensional.

21. O método dos elementos 12 e 13, em que as referidas células aderentes são obtidos a partir de uma cultura bidimensional.

22. O método dos elementos 12 e 13, em que a referida condição é selecionada a partir do grupo que consiste em células estaminais deficiência, doença do coração, doença de Parkinson, câncer, doença de Alzheimer, acidente vascular cerebral, queimaduras, perda de tecido, perda de sangue, anemia, doenças autoimunes, diabetes, artrite, esclerose múltipla, doença enxerto versus hospedeiro (GVHD), neuro degenerativa distúrbios, encefalomielite autoimune (EAE), lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite, esclerose sistêmica, síndrome de Sjorgen, a esclerose múltipla (EM), miastenia grave (MG), de Guillain-Barré Síndrome (GBS), tiroidite de Hashimoto (HT), a doença de Graves, diabetes dependente de insulina Melitus (IDDM) e Doença inflamatória intestinal.

23. O método de célula ou população de qualquer produto de

1, 2, 3 ou 20, em que a referida cultura de três dimensões compreende um Biorreator 3D.

24. O processo do item 23, em que o referido biorreator é selecionado a partir do grupo que consiste de um biorreator de fluxo tampão, um biorreator de tanque agitado contínuo e um biorreator de leito estacionário.

25. O método de célula ou população de qualquer produto de 1, 2, 3 ou 20, em que a referida cultura das referidas células é efetuada sob um fluxo contínuo de um meio de cultura.

26. O método de célula ou população de qualquer produto de 1, 2, 3 ou 20, em que a referida cultura de três dimensões compreende um material aderente selecionado a partir do grupo que consiste de um poliéster, um polialquileno, um polifluorado cloroetileno, um cloreto de polivinilo, um poliestireno, uma polissulfona, um acetato de celulose, uma fibra de vidro, uma partícula de cerâmica, um matrigel, um componente da matriz extracelular, um colagénio, um ácido poli láctico L e uma fibra de metal inerte.

27. O método ou população de células de qualquer um dos pontos 1, 2, 3, ou 20, em que a referida cultura é efetuada durante, pelo menos, 3 dias.

28. O método ou população de células do item 21, em que a referida cultura é efetuada durante, pelo menos, 3 dias.

29. O método de célula ou população de qualquer produto de 1, 2, 3 ou 20, em que a referida cultura é efetuada até que as referidas células aderentes atinjam, pelo menos, 60% de confluência.

30. Os métodos dos pontos 12 e 13, em que a condição pode beneficiar da facilitação do tronco hematopoéticas o enxerto de células.

31. Os métodos, população de células ou meio do item 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 20, em que as referidas células aderentes compreendem uma matriz de expressão do marcador positivo selecionado a partir do grupo que consiste em CD73, CD90, CD29 e CD105.

32. Os métodos, população de células ou meio do item 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 20, em que as referidas células aderentes compreendem uma matriz de expressão do marcador negativo selecionado de entre o grupo constituído por CD45, CD80, H1A-DR, CD11b, CD14, CD19, CD34 e CD79.

33. Os métodos, população de células ou meio do item 1, 2, 3, ou 20, em que as referidas células segregam um maior nível de pelo menos um factor seleccionado de entre o grupo que consiste em SCF, Flt-3 e IL-6 mais elevada do que secretado pelas células aderentes a partir de placenta ou tecido adiposo cultivadas numa cultura 2D.

34. Os métodos, a população de células ou do meio do item 1, 2, 3, ou 20, em que as referidas células aderentes expressam um nível elevado de pelo menos uma proteína seleccionada a partir do grupo consistindo de família histona H2A (H2AF), a aldeído desidrogenase X (X ALDH), tradução eucariótica fator de alongamento 2 (EEEF2), reticulocalbin 3, ligação EF mão-de cálcio domínio (RCN2) e calponina 1 músculo liso de base (CNN1) do que a segregada por células aderentes ou de placenta tecido adiposo cultivadas numa cultura 2D.

35. Os métodos, a população de células ou do meio do item 1, 2, 3, ou 20, em que as referidas células expressam uma aderentes inferior nível de expressão de pelo menos uma proteína selecionada a partir do grupo que consiste de ribonucleoproteína nuclear heterogéneo H1 (Hnrph1), antigénio CD44 isoforma precursor 2, 3 fosfoadenosina fosfossulfato 5 sintase 2 isoforma um (Papss2) e proteína ribossomal L7A (rpL7a) do que a segregada por células aderentes a partir de placenta ou tecido adiposo crescidas numa cultura 2D.

36. Os métodos, população de células ou meio do item 1, 2, 3, ou 20, em que o referido meio de células aderentes ou estão caracterizado por uma atividade imunossupressora superior do que a de células aderentes da placenta ou do tecido adiposo cultivadas numa cultura 2D.

37. A população isolada de células do ponto 36, em que a referida atividade imunossupressora compreende a redução em T proliferação celular.

38. O método ou população de células de qualquer um dos pontos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12, ou 13, em que as referidas células compreendem células tendo um fenótipo de células-tronco do estroma.

39. O processo do item 38, em que a referida haste de estroma fenótipo celular compreende a atividade de supressão de células T.

40. O processo do item 38, em que o referido fenótipo de células-tronco do estroma compreende atividade de suporte de células estaminais hematopoiéticas.

41. Utilização da população de células do ponto 3, 4, 5, 6, ou 7 para o fabrico de um medicamento identificado para o transplante.

REIVINDICAÇÕES

1. Células estromais aderentes de um tecido selecionado de entre o grupo consistindo de placenta e de tecido adiposo para utilização no tratamento de

(a) uma doença selecionada de entre o grupo que consiste em perda de sangue, anemia, doenças autoimunes, artrite, esclerose múltipla, enxerto vs. hospedeiro aguda (GVHD), encefalomielite autoimune (EAE), o lúpus eritematoso sistémico (SLE), artrite reumatoide, esclerose sistémica, síndrome de Sjogren, miastenia grave (MG), síndrome de Guillain-Barre (GBS), tiroidite de Hashimoto (HT), a doença de Graves, insulín-dependente diabetes mellitus (IDDM) e doença inflamatória intestinal; ou

(b) uma condição que pode beneficiar da facilitação do enxerto de células-tronco hematopoiéticas num sujeito, em que as referidas células estromais aderentes são obtidas a partir de uma cultura tridimensional.

2. Um meio condicionado de células estromais aderentes derivadas de um tecido selecionado de entre o grupo que consiste em tecido adiposo e da placenta para o uso no tratamento de uma condição selecionada de entre o grupo que consiste em desordens autoimunes, artrite, esclerose múltipla, doença enxerto versus hospedeiro (GVHD), encefalomielite autoimune (EAE), o lúpus eritematoso sistémico (SLE), artrite reumatoide, esclerose sistémica, síndrome de Sjogren, miastenia grave (MG), síndrome de Guillain-Barre (GBS), tiroidite de Hashimoto (HT), a doença de Graves, diabetes insulino-dependente mellitus (IDDM) e doença inflamatória intestinal, em que as referidas células estromais aderentes são obtidos a

partir de uma cultura tridimensional.

3. As células ou o meio para a utilização das reivindicações 1 ou 2, que compreende ainda a administração de células-tronco.

4. As células ou o meio para a utilização da reivindicação 3, em que as referidas células estaminais

- compreendem células estaminais hematopoiéticas e/ou
- são administradas concomitantemente com o referido meio condicionado ou células aderentes e/ou
- são administradas após a administração do referido meio de células aderentes ou condicionado.

5. As células ou o meio para a utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a referida cultura tridimensional compreende um biorreator 3D.

6. As células ou o meio para a utilização de acordo com a reivindicação 5, em que o referido biorreator é selecionado a partir do grupo que consiste de um biorreator de fluxo tampão, um biorreator de tanque com agitação contínua e um biorreator de leito estacionário.

7. As células ou o meio para a utilização de acordo com a reivindicação 1, em que

- a referida cultura das referidas células é efetuada sob um fluxo contínuo de um meio de cultura e/ou
- a referida cultura tridimensional compreende um material aderente selecionado a partir do grupo que consiste de um poliéster, um polialquileno, um polifluorado cloroetileno, um cloreto de polivinilo, um poliestireno, uma polissulfona, um

acetato de celulose, uma fibra de vidro, uma partícula de cerâmica, um matrigel, uma componente da matriz extracelular, um colagénio, um ácido poli láctico L e uma fibra de metal inerte e/ou

- a referida cultura é efetuada durante pelo menos 3 dias e/ou
- referida cultura é efetuada até que as referidas células aderentes atinjam pelo menos 60% de confluência e/ou
- as referidas células aderentes compreendam uma matriz de expressão do marcador positivo selecionado a partir do grupo que consiste em CD73, CD90, CD29 e CD105 e/ou
- as referidas células aderentes compreendem uma matriz de expressão do marcador negativo selecionado de entre o grupo que consiste em CD45, CD80, H1A-DR, CD11b, CD14, CD19, CD34 e CD79 e/ou
- as referidas células aderentes secretar um nível mais elevado de pelo menos um fator selecionado de entre o grupo que consiste em SCF, Flt-3 e IL-6 mais elevados do que a segregada por células aderentes a partir de placenta ou tecido adiposo cultivadas numa cultura 2D e/ou
- as referidas células aderentes expressa um nível mais elevado de pelo menos uma proteína selecionada a partir do grupo consistindo de família histona H2A (H2AF), a aldeído desidrogenase X (X ALDH), fator de translação eucariótica de alongamento 2 (EEEF2), reticulocalbin 3, cálcio não EF domínio (R.CN2) e calponina ligação 1 do músculo liso de base (CNNI) do que a segregada por células aderentes a partir de placenta ou tecido adiposo cultivadas numa cultura 2D e/ou
- as referidas células aderentes expressa um nível mais baixo de expressão de pelo menos uma proteína selecionada a partir do grupo que consiste em heterogénea ribonucleoproteínas nucleares HI (Hnrph1), CD44 antigénio isoforma 2 precursora, 3 fosfoadenosina 5 fosfossulfato sintase 2 isoforma um

(Papss2) e proteína ribossomal L7A (rpL7a) do que a segregada por células aderentes a partir de placenta ou tecido adiposo cultivadas numa cultura 2D.

8. As células ou o meio para a utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o referido meio de células aderentes ou são caracterizados por uma atividade imunossupressora superior do que a de células aderentes da placenta ou do tecido adiposo cultivadas numa cultura 2D.

9. As células ou o meio para a utilização de acordo com a reivindicação 8, em que a referida atividade imunossupressora compreende a redução na proliferação de células T.

10. As células ou o meio para a utilização das reivindicações 1 ou 2, em que as referidas células compreendem células possuindo um fenótipo de células-tronco do estroma.

11. As células ou o meio para a utilização de acordo com a reivindicação 10, em que o referido fenótipo de células estaminais estromais compreende atividade de supressão de células T e/ou a atividade de células estaminais hematopoiéticas.

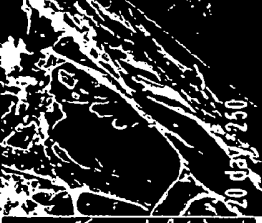


FIG.1A FIG.1B FIG.1C FIG.1D FIG.1E FIG.1F

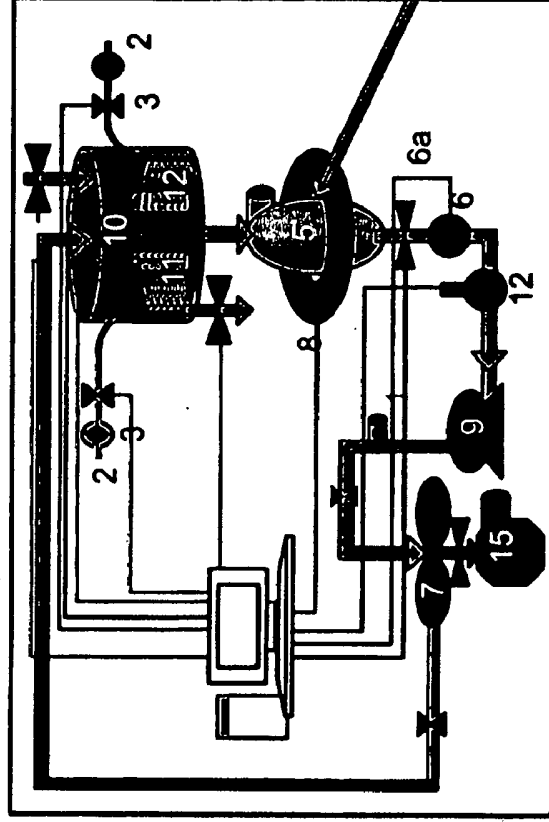


FIG.1G

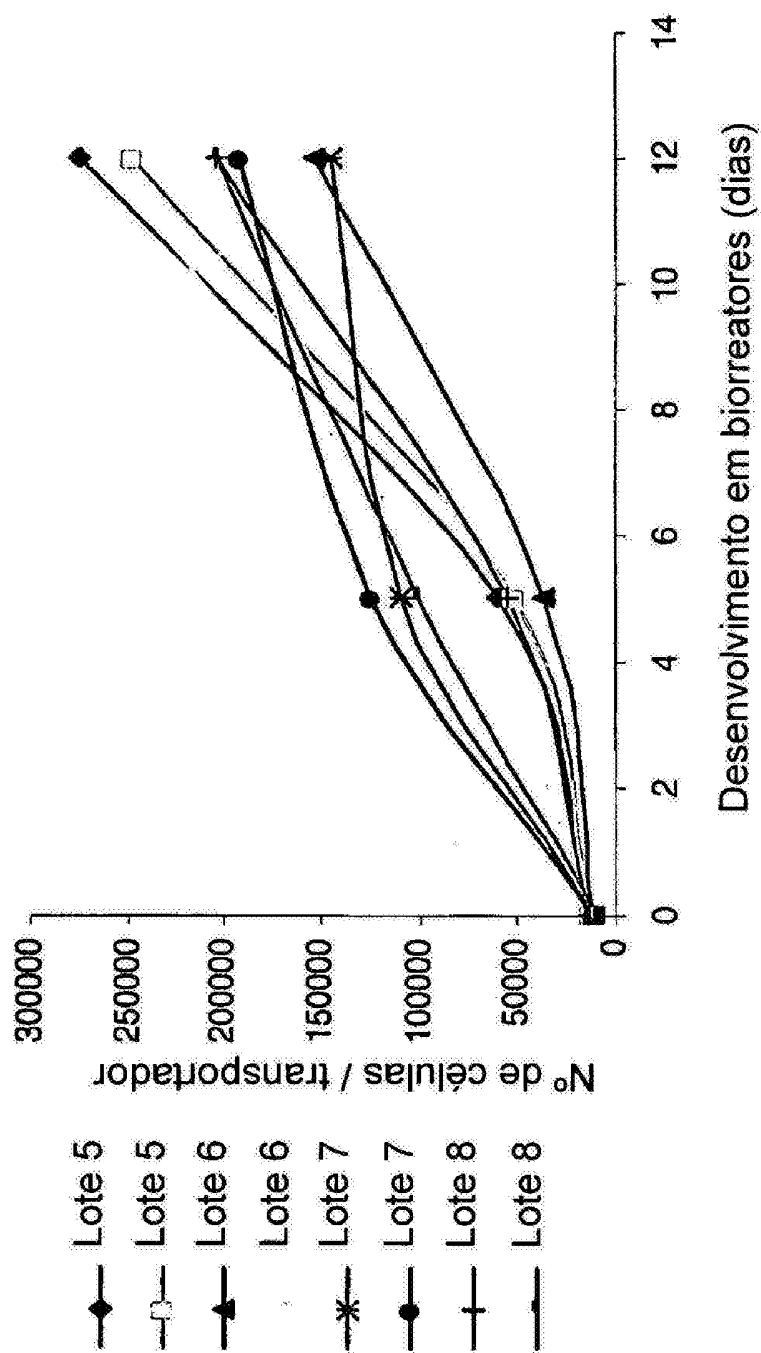


FIG.2

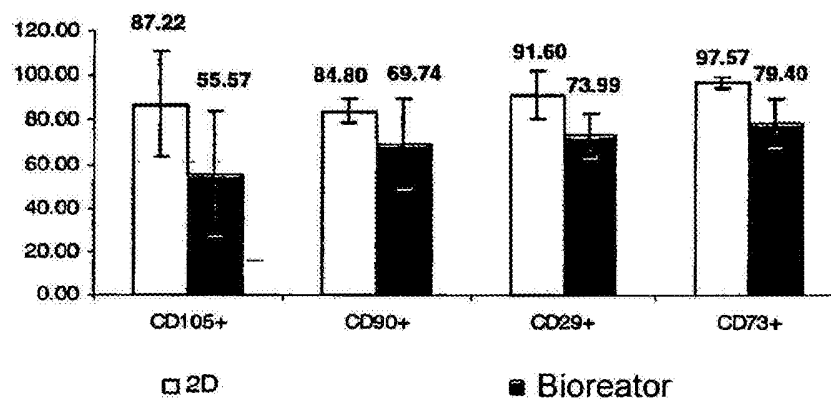


FIG.3A

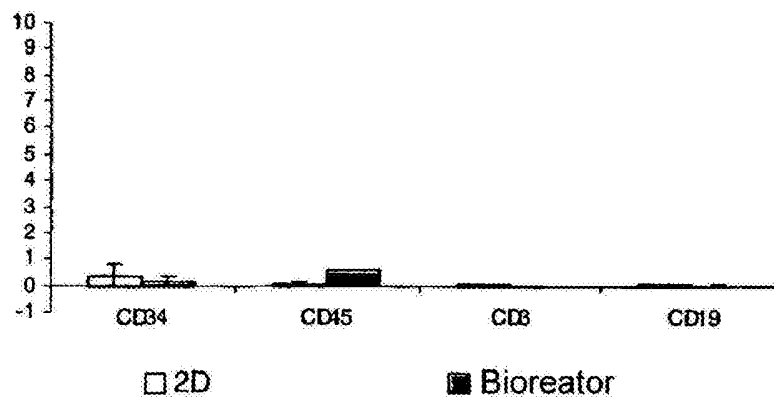


FIG.3B

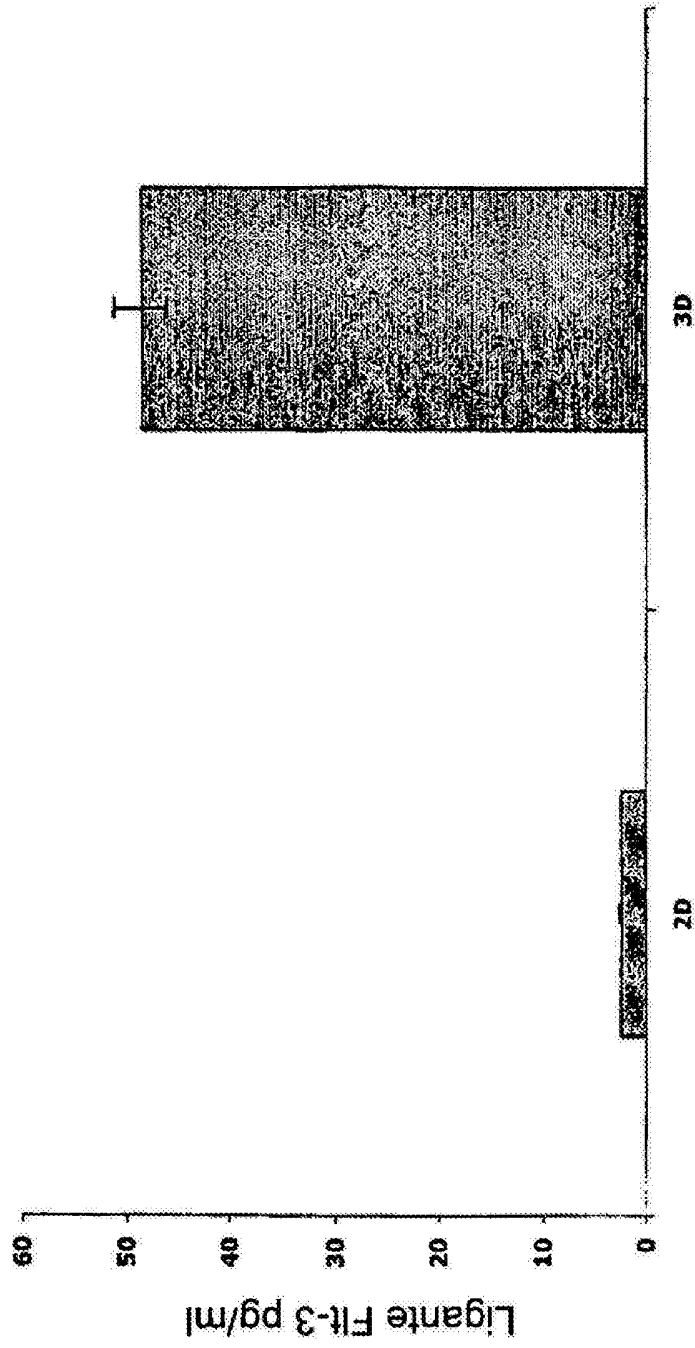


FIG.4A

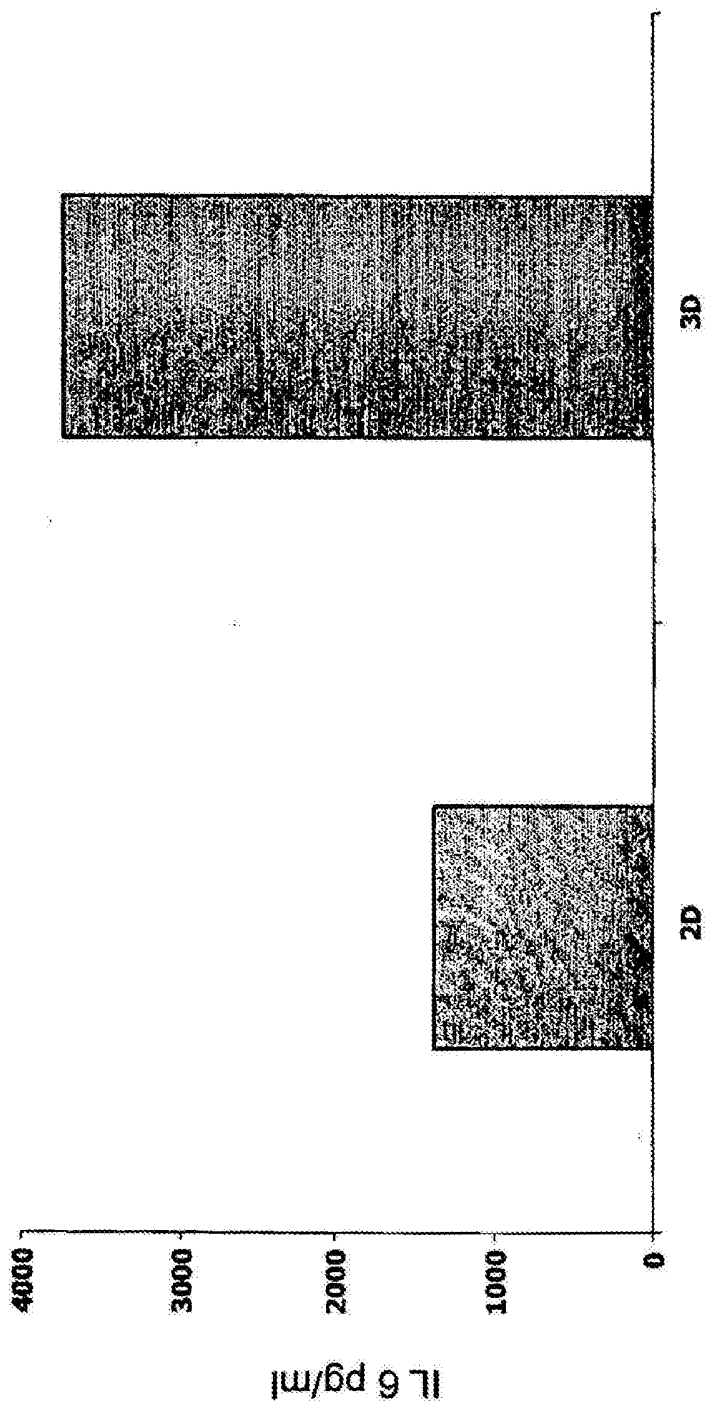


FIG.4B

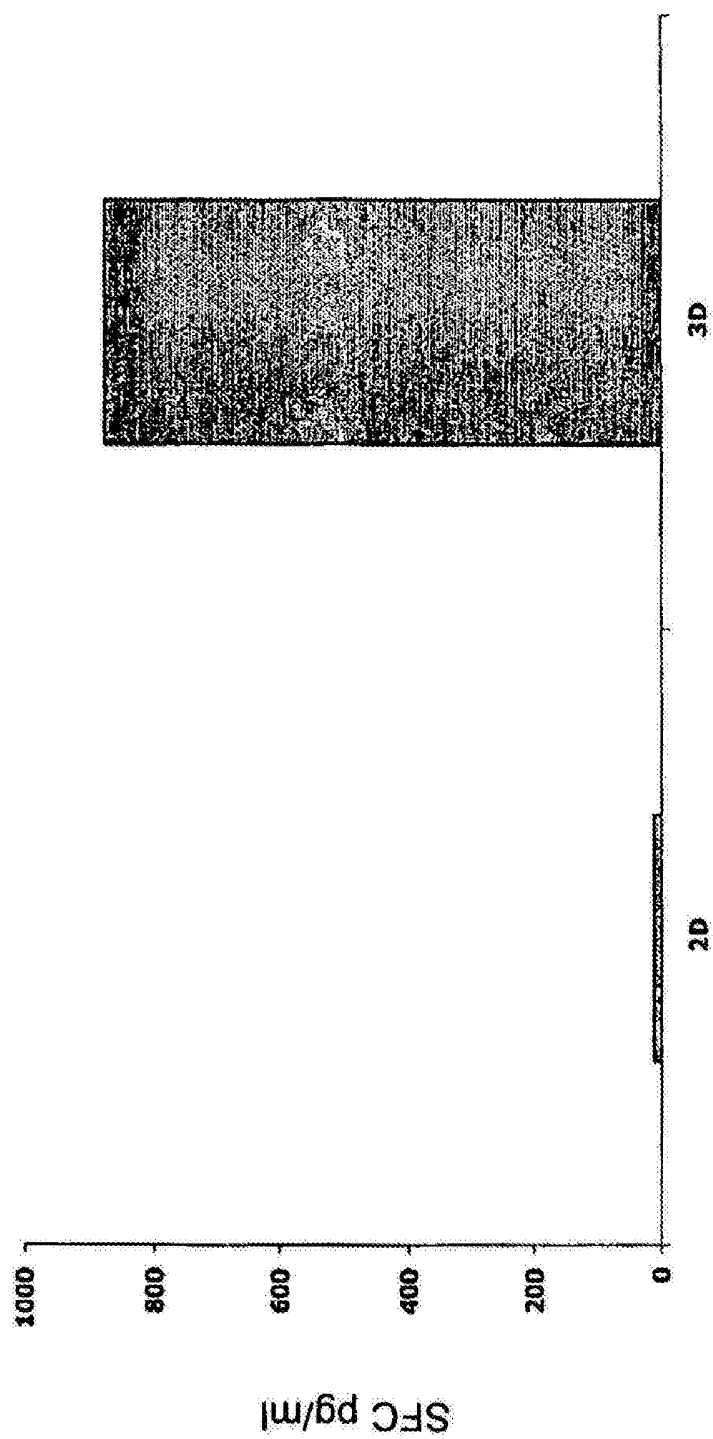


FIG.4C

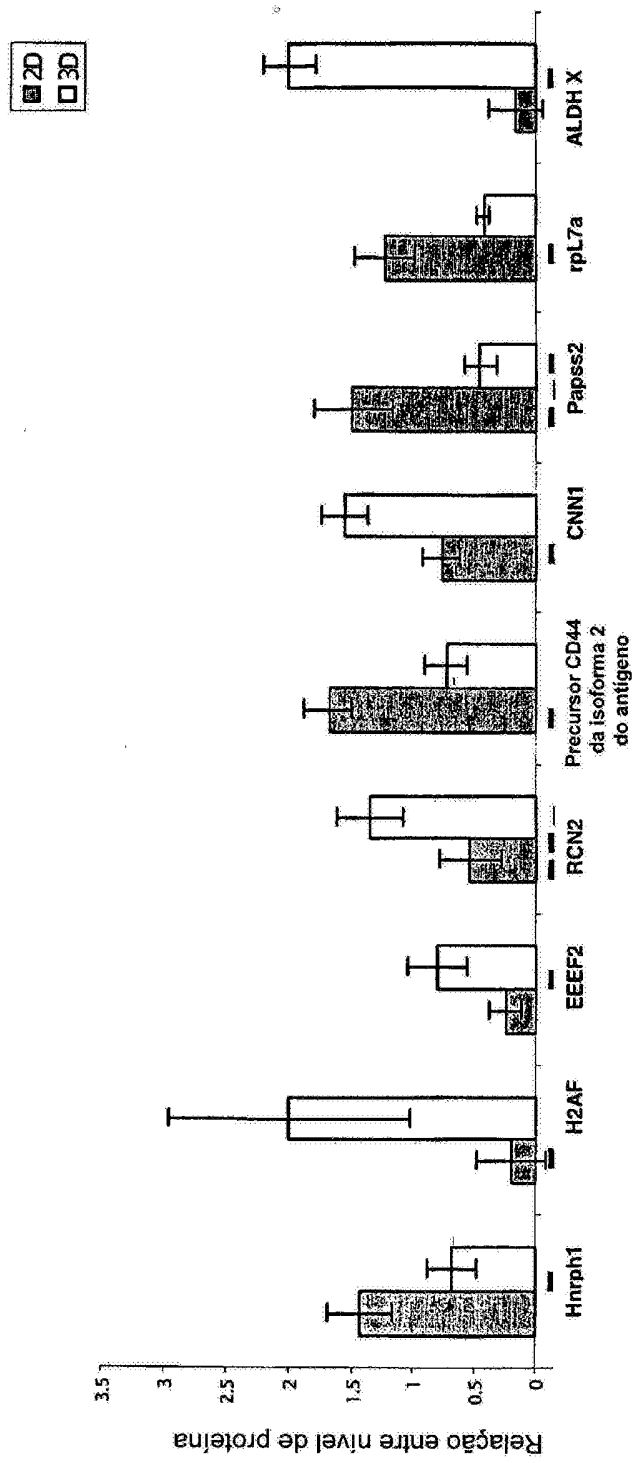


FIG.4D

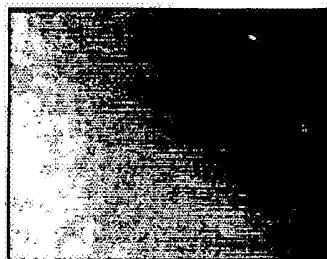


FIG.5A



FIG.5C

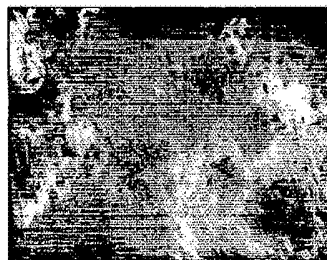


FIG.5B



FIG.5D

9/11

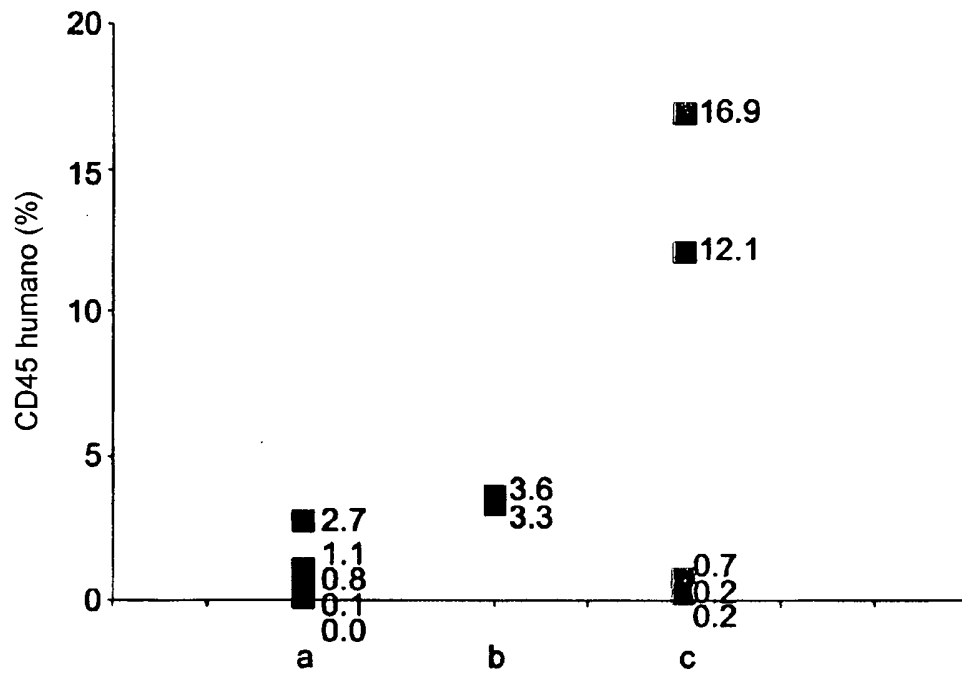
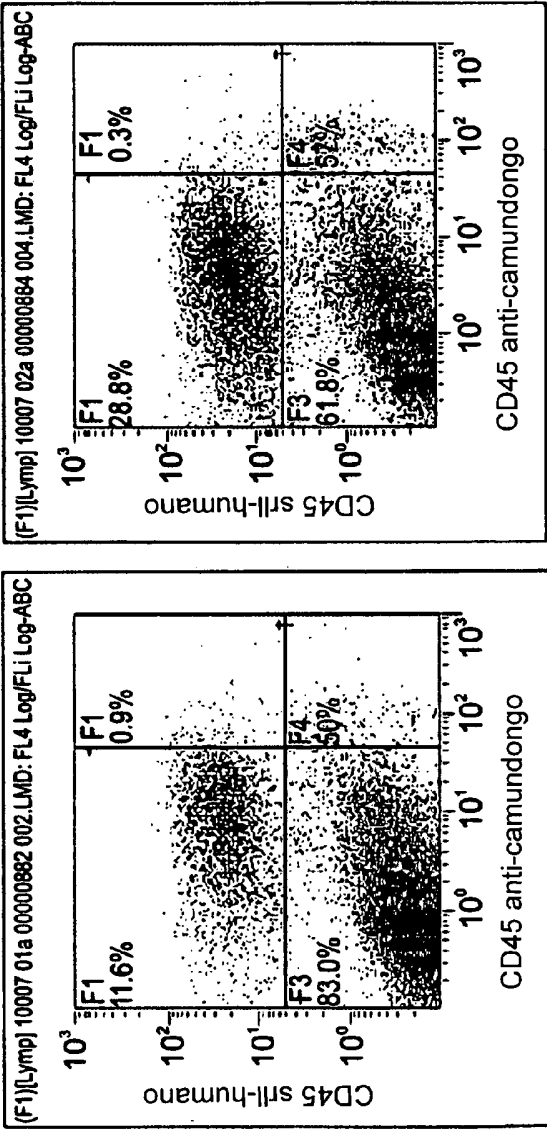


FIG.6



(F1)[Lymp] 10007 01a 00000882 002.LMD: Legenda

Cor	Nome	% Gated	% Total	Número	Células/ul
	CD45 + anti-humano	11.94	9.92	4961	ERRO
	CD45 + camundongo	83.37	4.46	2229	ERRO
	lymp	100.00	83.08	41542	ERRO

CD45 + humano (%)
CD45 + camundongo (%)

FIG.7A

(F1)[Lymp] 10007 02a 00000884 004.LMD: Legenda

Cor	Nome	% Gated	% Total	Número	Células/ul
	CD45 + anti-humano	29.23	4.81	12407	ERRO
	CD45 + camundongo	69.42	7.99	3997	ERRO
	lymp	100.00	84.88	42441	ERRO

FIG.7B

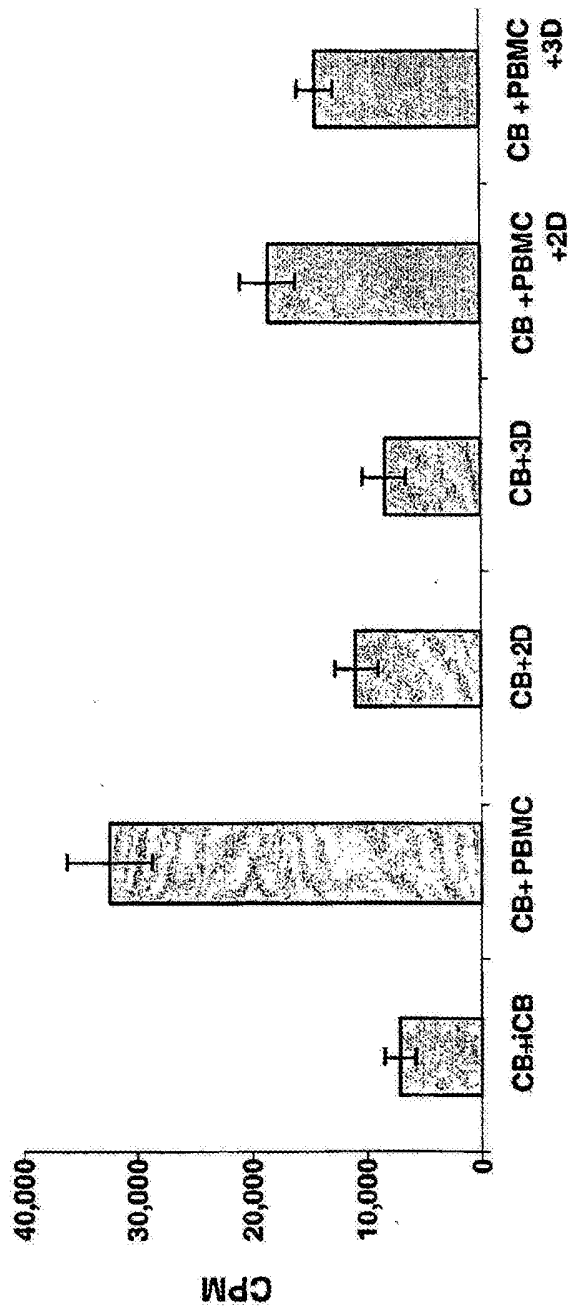


FIG.8