

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2008.09.29	(73) Titular(es): ANTHROGENESIS CORPORATION 7 POWDER HORN DRIVE WARREN, NJ 07059US
(30) Prioridade(s): 2007.09.28 US 995763 P 2008.08.20 US 90555 P	(72) Inventor(es):
(43) Data de publicação do pedido: 2010.07.07	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2014.11.26 042/2015	

(54) Epígrafe: **SUPRESSÃO DE TUMOR UTILIZANDO PERFUSATO PLACENTÁRIO HUMANO E CÉLULAS ASSASSINAS NATURAIS INTERMÉDIAS DERIVADAS DE PLACENTA HUMANAS**

(57) Resumo:

SÃO AQUI PROPORCIONADOS PERFUSATO PLACENTÁRIO, CÉLULAS DE PERFUSATO PLACENTÁRIO E CÉLULAS ASSASSINAS NATURAIS INTERMÉDIAS DERIVADAS DE PLACENTA, E SUAS COMBINAÇÕES. SÃO TAMBÉM AQUI PROPORCIONADAS COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO OS MESMOS, E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DE PERFUSATO PLACENTÁRIO, CÉLULAS DE PERFUSATO PLACENTÁRIO E CÉLULAS ASSASSINAS NATURAIS INTERMÉDIAS DERIVADAS DE PLACENTA, E SUAS COMBINAÇÕES, PARA SUPRIMIR O CRESCIMENTO OU PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS, CÉLULAS CANCEROSAS, E OUTRAS, E PARA TRATAR INDIVÍDUOS POSSUINDO CÉLULAS TUMORAIS. NUMA CONCRETIZAÇÃO PREFERIDA, A COMPOSIÇÃO COMPREENDE CÉLULAS ASSASSINAS NATURAIS CD56+, CD16.

RESUMO**"Supressão de tumor utilizando perfusato placentário humano e células assassinas naturais intermédias derivadas de placenta humanas"**

São aqui proporcionados perfusato placentário, células de perfusato placentário e células assassinas naturais intermédias derivadas de placenta, e suas combinações. São também aqui proporcionadas composições compreendendo os mesmos, e métodos de utilização de perfusato placentário, células de perfusato placentário e células assassinas naturais intermédias derivadas de placenta, e suas combinações, para suprimir o crescimento ou proliferação de células tumorais, células cancerosas, e outras, e para tratar indivíduos possuindo células tumorais. Numa concretização preferida, a composição compreende células assassinas naturais CD56⁺, CD16⁻.

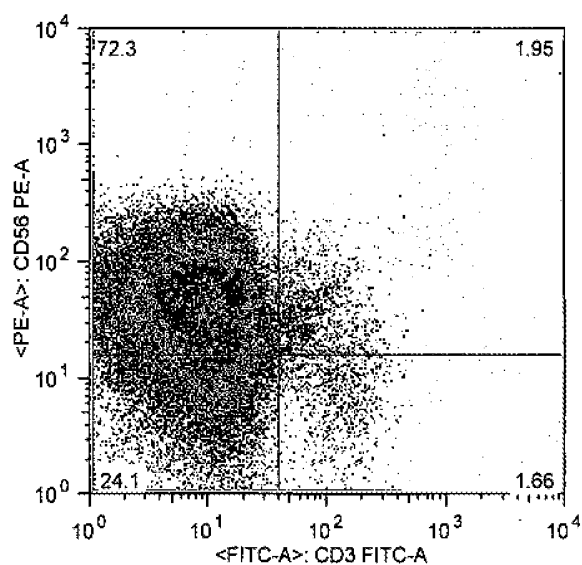


FIG. 1

DESCRIÇÃO

"Supressão de tumor utilizando perfusato placentário humano e células assassinas naturais intermédias derivadas de placenta humanas"

Este pedido de patente reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório dos E.U.A. N.º 60/995763, depositado em 28 de Setembro de 2008, e do Pedido de Patente Provisório dos E.U.A. N.º 61/090555, depositado em 21 de Agosto de 2008.

1. CAMPO

São aqui revelados métodos de supressão do crescimento ou proliferação de células tumorais por contacto das células tumorais com perfusato placentário, células derivadas de perfusato placentário, células assassinas naturais a partir de placenta, e.g., a partir de perfusato placentário, e/ou células assassinas naturais combinadas compreendendo células assassinas naturais a partir de placenta, e.g., a partir de perfusato placentário, e células assassinas naturais a partir de sangue do cordão umbilical. São também aqui revelados métodos de produção de uma população única de células assassinas naturais a partir de placenta, e.g., a partir de perfusato placentário, e.g., perfusato placentário humano. São aqui revelados adicionalmente métodos de utilização do perfusato placentário, e das células assassinas naturais a partir do mesmo, para suprimir a proliferação de células tumorais.

2. ANTECEDENTES

O perfusato placentário compreende uma colheita de células placentárias obtidas por passagem de uma solução de perfusão através da vasculatura placentária, e colheita do fluido de perfusão a partir da vasculatura, a partir da superfície materna da placenta, ou ambas. Métodos de perfusão de placentas de mamífero são descritos, e.g., na Patente dos E.U.A. N.º 7 045 146 e na Patente dos E.U.A. N.º 7 255 879. A população de células placentárias obtidas por perfusão é heterogénea, compreendendo células hematopoiéticas (CD34⁺), células nucleadas tais como granulócitos, monócitos e

macrófagos, uma pequena percentagem (menos de 1%) de células estaminais placentárias aderentes a substrato de cultura de tecidos, e células assassinas naturais. Até à data ninguém descreveu a utilização de perfusato placentário, ou de populações de células placentárias a partir de perfusato, na supressão da proliferação de células de tumor.

As células assassinas naturais (NK, *natural killer*) são linfócitos citotóxicos que constituem um componente principal do sistema imunitário inato. As células NK não exprimem receptores de antigénio de célula T (TCR), CD3 ou receptor de célula B de imunoglobulinas (Ig), mas usualmente exprimem os marcadores de superfície CD16 (Fc RIII) e CD56 em humanos. As células NK são citotóxicas; pequenos grânulos no seu citoplasma contêm proteínas especiais tais como perforina e proteases conhecidas como granzimas. Após libertação em estreita proximidade de uma célula programada para ser morta, a perforina forma poros na membrana celular da célula alvo através dos quais as granzimas e moléculas associadas podem entrar, induzindo apoptose. Uma granzima, granzima B (também conhecida como granzima 2 e serina-esterase 1 associada a linfócitos T citotóxicos), é uma serina-protease crucial para indução rápida da apoptose de células alvo na resposta imunitária mediada por células.

As células NK são activadas em resposta a interferões ou citoquinas derivadas de macrófago. As células NK activadas são referidas como células assassinas activadas por linfoquina (LAK). As células NK possuem dois tipos de receptores de superfície, classificados como "receptores activantes" e "receptores inibidores," que controlam a actividade citotóxica das células.

A utilização de uma composição compreendendo extracto de tecido derivado de placenta ou células CD34⁺ a partir de sangue do cordão umbilical ou tecido placentário para induzir a diferenciação de células cancerosas em células de malignidade reduzida, ou desprovidas de malignidade, é revelada na Publicação da Patente dos E.U.A. N.º 2007/0041954.

A Publicação da Patente dos E.U.A. N.º 2003/068306 refere-se a um meio e a um método para expandir células assassinas

naturais exprimindo o fenótipo CD56⁺CD3⁻, onde as células assassinas naturais podem ser obtidas a partir de qualquer fonte convencional, preferivelmente a partir de sangue periférico, medula óssea, sangue do cordão, linhas de células, ou sangue periférico estimulado por citoquina.

Takahashi E. et al., 2007, *Scandinavian Journal of Immunology* 65, 126-138, descreve a utilização de diferentes citoquinas para a indução de citotoxicidade antitumor de células assassinas naturais CD16⁺CD56^{bright} obtidas a partir de sangue periférico.

Roussev R.G. et al., 1993, *Journal of Reproductive Immunology* 25: 15-29, refere-se à caracterização fenotípica de leucócitos mononucleares placentários de humano.

Entre outras actividades, as células NK desempenham um papel na rejeição de tumores pelo hospedeiro. Porque as células cancerosas têm expressão de MHC classe I reduzida ou nula, estas podem-se tornar alvos de células NK. Dados clínicos acumulados sugerem que o transplante haploidêntico de células NK humanas isoladas a partir de PBMC ou medula óssea medeiam potentes efeitos anti-leucemia sem possuírem doença de enxerto versus hospedeiro (GVHD) detectável. Ver Ruggeri et al., *Science* 295:2097-2100 (2002)). Células assassinas naturais podem tornar-se activadas por células desprovidas, ou exibindo níveis reduzidos, de proteínas de complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Células NK e células LAK activadas e expandidas têm sido utilizadas tanto em terapia *ex vivo* como em tratamento *in vivo* de pacientes com cancro avançado, com algum sucesso contra doenças relacionadas com a medula óssea, tais como leucemia; cancro da mama; e certos tipos de linfoma. O tratamento por células LAK requer que o paciente receba primeiro IL-2, seguindo-se leucoferése e depois uma incubação e cultura *ex vivo* das células sanguíneas autólogas colhidas na presença de IL-2 durante alguns dias. As células LAK têm de ser reperfundidas em conjunto com doses relativamente elevadas de IL-2 para completar a terapia. Este tratamento de purga é dispendioso e pode causar efeitos colaterais graves. Estes incluem retenção de fluido, edema pulmonar, queda na pressão sanguínea e febre alta.

Apesar das propriedades vantajosas de células NK na morte de células tumorais e de células infectadas por vírus, continua a ser difícil trabalhar com elas e aplicá-las em imunoterapia, principalmente devido à dificuldade na manutenção das suas capacidades de direcção ao tumor e tumoricidas durante a cultura e expansão. Assim, existe uma necessidade na especialidade para um fornecimento fácil de células assassinas naturais.

3. SUMÁRIO

O presente invento refere-se a células de perfusato placentário nucleadas humanas para utilização num método para tratamento de um tumor num indivíduo, onde as células de perfusato placentário nucleadas humanas compreendem células assassinas naturais intermédias placentárias CD56⁺, CD16⁻ e podem ser obtidas por perfusão de uma placenta humana que foi drenada de sangue de cordão e lavada para remover sangue residual para produzir perfusato placentário compreendendo células placentárias nucleadas; e isolamento das células placentárias nucleadas a partir do referido perfusato placentário.

O presente invento refere-se adicionalmente a células assassinas naturais intermédias placentárias CD56⁺, CD16⁻ humanas para utilização num método para tratamento de um tumor num indivíduo, onde as referidas células assassinas naturais intermédias placentárias exprimem um ou mais dos microARNs hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618 ou hsa-miR-99a a um nível detectavelmente mais elevado do que células assassinas naturais de sangue periférico.

Finalmente, o presente invento refere-se a células assassinas naturais combinadas para utilização num método de tratamento de um tumor num indivíduo, onde as referidas células assassinas naturais combinadas compreendem células assassinas naturais intermédias placentárias CD56⁺, CD16⁻ isoladas a partir de perfusato placentário e células assassinas naturais

isoladas a partir de sangue do cordão umbilical e onde o referido sangue do cordão umbilical é isolado a partir da placenta a partir da qual o referido perfusato placentário é obtido, onde as referidas células assassinas naturais intermédias placentárias exprimem um ou mais dos microARNs hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618 ou hsa-miR-99a a um nível detectavelmente mais elevado do que células assassinas naturais de sangue periférico.

É aqui proporcionada a utilização de perfusato placentário humano; células a partir de perfusato placentário, e.g., células nucleadas totais a partir de perfusato placentário; combinações de células de perfusato placentário e células de sangue de cordão; e/ou células assassinas naturais a partir de placenta, e.g., células assassinas naturais a partir de perfusato placentário ou células assassinas naturais obtidas por digestão de tecido placentário, para suprimir a proliferação de células tumorais onde as células de perfusato placentário humanas compreendem células assassinas naturais intermédias placentárias CD56⁺, CD16⁻.

Num aspecto, é aqui proporcionado um método de supressão da proliferação de uma célula tumoral, ou população de células tumorais, compreendendo pôr em contacto a célula tumoral ou população de células tumorais com perfusato placentário humano onde as células de perfusato placentário humanas compreendem células assassinas naturais intermédias placentárias CD56⁺, CD16⁻. Numa concretização específica deste método, a célula tumoral é uma célula de cancro sanguíneo. Noutra concretização específica, as células tumorais são células de cancro sanguíneo. Noutra concretização específica, a célula tumoral é uma célula de tumor sólido. Noutra concretização específica, as células tumorais são células de tumor sólido. Noutra concretização, a célula tumoral é uma célula de carcinoma ductal primário, uma célula de leucemia, uma célula de leucemia de células T aguda, uma célula de linfoma mielóide crónico (CML), uma célula de leucemia mielógena aguda, uma célula de leucemia mielógena crónica (CML), uma célula de carcinoma do

pulmão, uma célula de adenocarcinoma do cólon, uma célula de linfoma histiocítico, uma célula de mieloma múltiplo, uma célula de retinoblastoma, uma célula de carcinoma colo-rectal, ou uma célula de adenocarcinoma colo-rectal. Noutra concretização específica, o referido contacto ocorre *in vitro*. Noutra concretização específica, o referido contacto ocorre *in vivo*. Numa concretização mais específica, o referido contacto *in vivo* ocorre num humano.

Noutra concretização específica, o referido perfusato placentário humano é perfusato que se fez passar através da vasculatura placentária, *e.g.*, apenas através da vasculatura placentária. Noutra concretização específica, fez-se passar o referido perfusato placentário através da vasculatura placentária e recolheu-se a partir da face maternal da placenta. Noutra concretização específica, a totalidade, ou substancialmente a totalidade (*e.g.*, mais de 90%, 95%, 98% ou 99%) das células no referido perfusato placentário são células fetais. Noutra concretização específica, o perfusato placentário compreende células fetais e maternas. Numa concretização mais específica, as células fetais no referido perfusato placentário compreendem menos do que cerca de 90%, 80%, 70%, 60% ou 50% das células no referido perfusato. Noutra concretização específica, o referido perfusato é obtido por passagem de uma solução de NaCl a 0,9% através da vasculatura placentária. Noutra concretização específica, o referido perfusato compreende um meio de cultura. Noutra concretização específica, o referido perfusato foi tratado para remover uma pluralidade de eritrócitos.

Noutro aspecto, é aqui proporcionado um método de supressão da proliferação de uma célula tumoral ou pluralidade de células tumorais compreendendo pôr em contacto a célula tumoral ou pluralidade de células tumorais com uma pluralidade de células de perfusato placentário humanas onde as células de perfusato placentário humanas compreendem células assassinas naturais intermédias placentárias CD56⁺, CD16⁻. Noutra concretização específica, a referida pluralidade de células de perfusato placentário são, ou compreendem, células nucleadas totais a partir de perfusato placentário. Noutra concretização específica, o referido perfusato placentário ou células de perfusato placentário, *e.g.*, células nucleadas totais a partir

de perfusato placentário, foi tratado para remover pelo menos um tipo de célula. Noutra concretização específica, o referido contacto ocorre *in vitro*. Noutra concretização específica, o referido contacto ocorre *in vivo*. Numa concretização mais específica, o referido contacto *in vivo* ocorre num mamífero, e.g., um humano. De acordo com o invento, as referidas células de perfusato placentário foram tratadas para enriquecimento em células assassinas naturais CD56⁺CD16⁻, e.g., células assassinas naturais intermédias placentárias (PINK), e.g., obtidas a partir de células de perfusato placentário ou células placentárias obtidas por disrupção mecânica ou enzimática de tecido placentário. Noutra concretização específica, as referidas células CD56⁺CD16⁻ são seleccionadas por micropérolas conjugadas com CD56. Noutra concretização específica, as referidas células CD56⁺CD16⁻ compreendem células que exibem expressão detectavelmente mais baixa de NKG2D, NKp46 ou CD94 do que um número equivalente de células assassinas naturais CD56⁺CD16⁺. Noutra concretização específica, as células PINK são CD3⁻. Numa concretização mais específica, pelo menos 50% das células nas referidas células de perfusato placentário são as referidas células CD56⁺CD16⁻. Numa concretização mais específica, onde as células CD56⁺CD16⁻ são pelo menos 50% das células de perfusato placentário, a célula tumoral é uma célula de carcinoma ductal primário, uma célula de leucemia, uma célula de leucemia de células T aguda, uma célula de linfoma mielóide crónico (CML), uma célula de leucemia mielógena aguda, uma célula de leucemia mielógena crónica (CML), uma célula de carcinoma do pulmão, uma célula de adenocarcinoma do cólon, uma célula de linfoma histiocítico, uma célula de mieloma múltiplo, uma célula de retinoblastoma, uma célula de carcinoma colo-rectal ou uma célula de adenocarcinoma colo-rectal. Em concretizações específicas, o referido contacto é contacto *in vitro*. Noutra concretização, o referido contacto é contacto *in vivo*, e.g., num mamífero, e.g., um humano.

Noutro aspecto, é aqui proporcionado um método de supressão da proliferação de uma célula tumoral ou pluralidade de células tumorais compreendendo pôr em contacto a célula tumoral ou pluralidade de células tumorais com uma pluralidade de células assassinas naturais CD56⁺CD16⁻ a partir de placenta, e.g., células PINK. Numa concretização específica, as células assassinas naturais a partir de placenta são células assassinas

naturais obtidas a partir de perfusato placentário humano. Noutra concretização específica, as células assassinas naturais são células assassinas naturais obtidas por disrupção física e/ou digestão enzimática de tecido placentário. Noutra concretização específica, as referidas células assassinas naturais são seleccionadas, e.g., a partir de células de perfusato placentário ou células obtidas por disrupção física e/ou digestão enzimática de tecido placentário, por micropérolas conjugadas com CD56. Noutra concretização específica, as células assassinas naturais são CD3⁻. Numa concretização específica, a pluralidade de células assassinas naturais é pelo menos 80% das células na população de células que compreende as células assassinas naturais. Noutra concretização específica, o referido contacto ocorre *in vitro*. Noutra concretização específica, o referido contacto ocorre *in vivo*. Numa concretização mais específica, o referido contacto *in vivo* ocorre num mamífero, e.g., um humano.

Noutra concretização específica do método, a referida pluralidade de células assassinas naturais CD56⁺CD16⁻ humanas compreende células que exibem expressão detectavelmente mais baixa de NKG2D, NKP46 ou CD94 do que um número equivalente de células assassinas naturais CD56⁺CD16⁺. Noutra concretização específica, a referida pluralidade de células assassinas naturais, e.g., células PINK, exprime um ou mais dos microARNs hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618 e/ou hsa-miR-99a a um nível detectavelmente mais elevado do que células assassinas naturais de sangue periférico.

Noutra concretização específica, a referida pluralidade de células assassinas naturais CD56⁺CD16⁻ humanas, e.g., células PINK, são postas em contacto com um composto imunomodulador numa quantidade e durante um tempo suficientes para a referida pluralidade de células assassinas naturais exprimir detectavelmente mais granzima B do que um número equivalente das referidas células assassinas naturais não postas em contacto com o referido composto imunomodulador. Numa concretização mais específica, o referido composto

imunomodulador é lenalidomida ou pomalidomida. Noutra concretização específica, a referida pluralidade de células assassinas naturais, e.g., células PINK, é posta em contacto com um composto imunomodulador numa quantidade e durante um tempo suficientes para as referidas células assassinas naturais exibirem detectavelmente mais citotoxicidade em relação às referidas células tumorais do que um número equivalente das referidas células assassinas naturais não postas em contacto com o referido composto imunomodulador, e.g., lenalidomida ou pomalidomida. Noutra concretização específica, a referida pluralidade de células assassinas naturais, e.g., células PINK, exprime um ou mais de BAX, CCL5, CCR5, CSF2, FAS, GUSB, IL2RA ou TNFRSF18 a um nível mais elevado do que um número equivalente das referidas células assassinas naturais não postas em contacto com o referido composto imunomodulador. Noutra concretização específica, a referida pluralidade de células assassinas naturais, e.g., células PINK, exprime um ou mais de ACTB, BAX, CCL2, CCL3, CCL5, CCR5, CSF1, CSF2, ECE1, FAS, GNLV, GUSB, GZMB, IL1A, IL2RA, IL8, IL10, LTA, PRF1, PTGS2, SKI e TBX21 a um nível mais elevado do que um número equivalente das referidas células assassinas naturais não postas em contacto com o referido composto imunomodulador.

Noutra concretização, as células assassinas naturais CD56⁺CD16⁻ humanas a partir de placenta são combinadas com células assassinas naturais a partir de outra fonte, e.g., sangue placentário e/ou sangue do cordão umbilical, e.g., para formar células assassinas naturais combinadas. Como aqui utilizada, a frase "célula(s) assassina(s) natural(ais) a partir de placenta" não inclui células assassinas naturais a partir de sangue do cordão umbilical ou sangue placentário. Em concretizações mais específicas, as células assassinas naturais a partir de placenta são combinadas com células assassinas naturais a partir de outra origem numa proporção de cerca de 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100, ou outra.

Em concretizações específicas, as células assassinas naturais combinadas não são cultivadas, e compreendem: um número detectavelmente mais elevado de células assassinas naturais $CD3^-CD56^+CD16^-$ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico; um número detectavelmente mais baixo de células assassinas naturais $CD3^-CD56^+CD16^+$ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico; um número detectavelmente mais elevado de células assassinas naturais $CD3^-CD56^+KIR2DL2/L3^+$ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico; um número detectavelmente mais baixo de células assassinas naturais $CD3^-CD56^+NKp46^+$ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico; um número detectavelmente mais elevado de células assassinas naturais $CD3^-CD56^+NKp30^+$ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico; um número detectavelmente mais elevado de células assassinas naturais $CD3^-CD56^+2B4^+$ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico; ou um número detectavelmente mais elevado de células assassinas naturais $CD3^-CD56^+CD94^+$ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico. Noutras concretizações específicas, as células assassinas naturais combinadas são cultivadas e compreendem: um número detectavelmente mais baixo de células assassinas naturais $CD3^-CD56^+KIR2DL2/L3^+$ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico; um número detectavelmente mais elevado de células assassinas naturais $CD3^-CD56^+NKp46^+$ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico; um número detectavelmente mais elevado de células assassinas naturais $CD3^-CD56^+NKp44^+$ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico; um número detectavelmente mais elevado de células assassinas naturais $CD3^-CD56^+NKp30^+$ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico.

Numa concretização específica de qualquer dos métodos acima, a célula tumoral é uma célula de tumor sólido. Noutra concretização específica, a célula tumoral é uma célula de

tumor líquido, *e.g.*, uma célula de tumor sanguíneo. Em concretizações mais específicas, a célula tumoral é uma célula de carcinoma ductal primário, uma célula de leucemia, uma célula de leucemia de células T aguda, uma célula de linfoma mielóide crónico (CML), uma célula de leucemia mielógena aguda, uma célula de leucemia mielógena crónica (CML), uma célula de carcinoma do pulmão, uma célula de adenocarcinoma do cólon, uma célula de linfoma histiocítico, uma célula de mieloma múltiplo, uma célula de retinoblastoma, uma célula de carcinoma colo-rectal ou uma célula de adenocarcinoma colo-rectal.

Noutro aspecto, é aqui proporcionada uma composição compreendendo células assassinas naturais CD56⁺, CD16⁻ placentárias isoladas, *e.g.*, células PINK. Numa concretização específica, as referidas células assassinas naturais placentárias são isoladas a partir de perfusato placentário humano. Noutra concretização específica, as referidas células assassinas naturais placentárias são isoladas a partir de placenta por disrupção física e/ou digestão enzimática de tecido placentário. Noutra concretização específica, as referidas células assassinas naturais CD56⁺CD16⁻ humanas compreendem pelo menos 50% das células na composição. Numa concretização específica, as referidas células assassinas naturais compreendem pelo menos 80% das células na composição. A referida composição pode também compreender células assassinas naturais CD56⁺, CD16⁺ isoladas. As referidas células assassinas naturais CD56⁺, CD16⁺ podem ser de um indivíduo diferente das referidas células assassinas naturais CD56⁺, CD16⁻. Noutra concretização específica, as referidas células assassinas naturais CD56⁺, CD16⁻ isoladas são de um único indivíduo. Numa concretização mais específica, as referidas células assassinas naturais CD56⁺, CD16⁻ isoladas compreendem células assassinas naturais de pelo menos dois indivíduos diferentes. Noutra concretização específica, as referidas células assassinas naturais placentárias, *e.g.*, as referidas células PINK, são expandidas.

Numa concretização mais específica, a composição compreende células assassinas naturais placentárias e células assassinas naturais a partir de outra origem. Numa concretização específica, a referida outra origem é sangue do cordão e/ou sangue do cordão umbilical. Noutra concretização

específica, a referida outra origem é sangue periférico. Em concretizações mais específicas, as células assassinas naturais a partir de placenta são combinadas com células assassinas naturais a partir de outra origem numa proporção de cerca de 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 ou outra.

Noutra concretização específica, a composição compreende perfusato placentário isolado. Numa concretização mais específica, o referido perfusato placentário é do mesmo indivíduo que as referidas células assassinas naturais. Noutra concretização mais específica, o referido perfusato placentário compreende perfusato placentário de um indivíduo diferente das referidas células assassinas naturais. Noutra concretização específica, a totalidade, ou substancialmente a totalidade (e.g., mais de 90%, 95%, 98% ou 99%) das células no referido perfusato placentário são células fetais. Noutra concretização específica, o perfusato placentário compreende células fetais e maternas. Numa concretização mais específica, as células fetais no referido perfusato placentário compreendem menos do que cerca de 90%, 80%, 70%, 60% ou 50% das células no referido perfusato. Noutra concretização específica, o referido perfusato é obtido por passagem de uma solução de NaCl a 0,9% através da vasculatura placentária. Noutra concretização específica, o referido perfusato compreende um meio de cultura. Noutra concretização específica, o referido perfusato foi tratado para remover uma pluralidade de eritrócitos.

Noutra concretização específica, a composição compreende células de perfusato placentário humanas onde as células de perfusato placentário humanas compreendem células assassinas naturais intermédias placentárias CD56⁺, CD16⁻. Numa concretização mais específica, as referidas células de perfusato placentário humanas são do mesmo indivíduo que as referidas células assassinas naturais. Noutra concretização mais específica, as referidas células de perfusato placentário

são de um indivíduo diferente das referidas células assassinas naturais. Noutra concretização específica, a composição compreende perfusato placentário isolado e células de perfusato placentário isolado, onde o referido perfusato isolado e as referidas células de perfusato placentário isolado são de diferentes indivíduos. Noutra concretização mais específica de qualquer das concretizações anteriores compreendendo perfusato placentário, o referido perfusato placentário compreende perfusato placentário de pelo menos dois indivíduos. Noutra concretização mais específica de qualquer das concretizações anteriores compreendendo células de perfusato placentário, as referidas células de perfusato placentário isolado são de pelo menos dois indivíduos. A composição pode compreender adicionalmente células PINK isoladas, onde as células PINK são de um indivíduo diferente do referido perfusato placentário ou das referidas células de perfusato.

É também aqui revelado um método de isolamento de células assassinas naturais placentárias, compreendendo a obtenção de uma pluralidade de células placentárias, e isolamento de células assassinas naturais a partir da referida pluralidade de células placentárias. As células placentárias são, ou compreendem, células de perfusato placentário, e.g., células nucleadas totais a partir de perfusato placentário. A referida pluralidade de células placentárias pode ser ou pode compreender, células placentárias obtidas por disrupção mecânica e/ou digestão enzimática de tecido placentário. O referido isolamento pode ser realizado utilizando um ou mais anticorpos. O referido um ou mais anticorpos podem compreender um ou mais dos anticorpos para CD3, CD16 ou CD56. O referido isolamento pode compreender o isolamento de células CD56⁺ de células CD56⁻ na referida pluralidade de células placentárias. Mais especificamente, o referido isolamento compreende o isolamento de células placentárias CD56⁺, CD16⁻ de células placentárias que são CD56⁻ ou CD16⁺. Mais especificamente, o referido isolamento compreende o isolamento de células placentárias CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻ de células placentárias que são CD56⁻, CD16⁺ ou CD3⁺. O referido método de isolamento de células assassinas naturais placentárias pode resultar numa população de células placentárias que é pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%,

70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou pelo menos 99% de células assassinas naturais CD56⁺, CD16⁻.

Em certas concretizações dos métodos acima, as células de perfusato placentário foram expandidas em cultura. Em várias concretizações, as células foram expandidas durante pelo menos, cerca de, ou não mais do que, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 dias. Numa concretização específica, as referidas células de perfusato placentário foram expandidas na presença de uma camada alimentadora e/ou na presença de pelo menos uma citocina. Numa concretização mais específica, a referida camada alimentadora compreende células K562 ou células mononucleares de sangue periférico. Noutra concretização mais específica, referida pelo menos uma citocina é interleucina-2.

3.1. Definições

Como aqui utilizado, "células assassinas naturais combinadas" são células assassinas naturais, e.g., a partir de cordão umbilical e perfusato placentário humano correspondentes, onde o perfusato placentário é obtido a partir da mesma placenta que o sangue do cordão. As células assassinas naturais de ambos são isoladas separadamente ou ao mesmo tempo, e combinadas.

Como aqui utilizados, "PINK" e "células PINK" referem-se a células assassinas naturais intermédias placentárias que são obtidas a partir de placenta humana, e.g., perfusato placentário humano ou tecido placentário que foi quebrado mecanicamente e/ou enzimaticamente. As células são CD56⁺ e CD16⁻, e.g., como determinado por citometria de fluxo, e.g., separação de células activadas por fluorescência utilizando anticorpos para CD56 e CD16. As células PINK não são obtidas a partir de sangue do cordão ou sangue periférico.

Como aqui utilizado, "perfusato placentário" significa uma solução de perfusão que se fez passar através de pelo menos parte de uma placenta, e.g., uma placenta humana, e.g., através da vasculatura placentária, incluindo uma pluralidade de

células recolhidas pela solução de perfusão durante a passagem através da placenta.

Como aqui utilizado, "células de perfusato placentário" significa células nucleadas, e.g., células nucleadas totais, isoladas a partir de, ou isoláveis a partir de, perfusato placentário.

Como aqui utilizadas, "supressão de células tumorais", "supressão da proliferação de células tumorais" e outras, inclui abrandamento do crescimento de uma população de células tumorais, e.g., por morte de uma ou mais das células tumorais na referida população de células tumorais, por exemplo, por contacto da população de células tumorais com células PINK, uma população de células compreendendo células PINK, células assassinas naturais combinadas, uma população de células compreendendo células assassinas naturais combinadas, perfusato placentário humano, ou outros.

4. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A FIG. 1 mostra resultados de citometria de fluxo utilizando anticorpos anti-CD3 e anticorpos anti-CD56 para células seleccionadas por micropérolas de CD56 a partir de perfusato placentário humano (HPP). A maior parte das células isoladas são CD56⁺CD3⁻.

A FIG. 2 ilustra a produção de citocinas por células PINK e/ou células tumorais durante 24 de cultura. A FIG. 2A ilustra a secreção de interferão gama (IFN γ) por células assassinas naturais intermédias (PINK) derivadas de perfusato placentário sozinhas ou na presença de células tumorais KG-1a. Células PINK e células KG-1a foram cultivadas sozinhas ou em combinação numa proporção de 1:1. Eixo dos Y: picogramas de IFN γ produzidos pelas culturas. A FIG. 2B ilustra a secreção de factor estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) por células PINK sozinhas ou na presença de células tumorais KG-1a. Células PINK e células KG-1a foram cultivadas sozinhas ou em combinação numa proporção de 1:1. Eixo dos Y: picogramas de GM-CSF produzidos pelas culturas.

A FIG. 3 ilustra a citotoxicidade de células PINK para células tumorais KG-1a em co-cultura de 24 horas numa proporção de 1:1, 5:1, 10:1 ou 20:1 de células PINK para células tumorais. Eixo dos X: proporção de células PINK para células tumorais. Eixo dos Y: percentagem de células tumorais mortas em comparação com células tumorais sem células PINK.

A FIG. 4 ilustra a citotoxicidade de células NK placentárias e células NK de sangue periférico (PB) cultivadas durante 21 dias em relação a células K562. As barras de erro representam o desvio padrão de 4 unidades de células NK placentárias cultivadas ou 3 unidades de células NK de sangue periférico cultivadas.

A FIG. 5 ilustra a citotoxicidade de perfusato placentário humano inteiro, conforme obtido a partir da placenta, para células tumorais KG-1a em co-cultura de 24 horas numa proporção de 1:1, 5:1, 10:1 ou 20:1 ou 100:1 de células de HPP para células tumorais. Eixo dos X: proporção de células de HPP para células tumorais. Eixo dos Y: percentagem de células tumorais mortas em comparação com células tumorais sem células de HPP.

A FIG. 6 ilustra a citotoxicidade de perfusato placentário humano inteiro, conforme obtido a partir da placenta, e de sangue do cordão umbilical, para células tumorais KG-1a em co-cultura de 48 horas em diluições em série de 100:1, 50:1, 25:1, 12,5:1, 6,25:1, 3,12:1, 1,56:1 ou 0,78:1 células de HPP ou células de UCB para células tumorais. Eixo dos X: proporção de células de HPP ou células de cordão umbilical para células tumorais. Eixo dos Y: percentagem de células tumorais mortas após um tempo de cultura de 48 horas em comparação com células tumorais sem células de HPP ou células de cordão umbilical.

A FIG. 7 ilustra a citotoxicidade de perfusato placentário humano inteiro, conforme obtido a partir da placenta para células tumorais KG-1a em co-cultura de 48 horas em diluições em série de 100:1, 50:1, 25:1, 12,5:1, 6,25:1, 3,12:1, 1,56:1 ou 0,78:1 células de HPP para células tumorais. Utilizou-se perfusato quer conforme colhido quer estimulado durante 24 horas com 100 U/mL ou 1000 U/mL de interleucina-2 (IL-2). Eixo dos X: proporção de células de HPP para células tumorais. Eixo dos Y: percentagem de células tumorais mortas após um tempo de

cultura de 48 horas em comparação com células tumorais sem células de HPP.

A FIG. 8 ilustra o efeito citotóxico de perfusato placentário humano em relação a um painel de linhas de células tumorais após cultura com células de HPP ou UCB numa proporção de 50:1 para as células tumorais. FIG 8A: co-cultura durante 24 horas. FIG. 8B: co-cultura durante 48 horas. Eixo dos X: linha de células tumorais testada. Eixo dos Y: percentagem de células tumorais mortas após co-cultura, em comparação com o número de células tumorais na ausência de células tumorais.

A FIG. 9 ilustra a produção de IFN por células de HPP co-cultivadas com células tumorais KG-1a com diferentes proporções de células de HPP para células tumorais. Eixo dos X: Condições experimentais, incluindo proporção de células de HPP para células tumorais. Eixo dos Y: Níveis de IFN por mililitro após co-cultura durante 24 horas.

FIG. 10 Produção de IFN por células de HPP ou UCB em co-cultura com um painel de células tumorais. Cultivaram-se células de HPP ou UCB numa proporção de 50:1 com linhas de células tumorais durante 24 horas (FIG. 10A) ou 48 horas (FIG. 10B). Determinaram-se os níveis de IFN pelo ensaio Luminex (HCYTO-60K-03, Millipore). Eixo dos X: linha de células tumorais testada. Eixo dos Y: picogramas de IFN produzidos por células de HPP ou UCB, em comparação com os picogramas de IFN produzidos na ausência de células tumorais.

A FIG. 11 ilustra a redução em tamanho de tumor após administração de 2×10^7 células de perfusato placentário humano (HPP) a ratinhos possuindo tumores de célula KG-1 com um volume de aproximadamente 332 mm^3 . Intratumor - as células de HPP foram injectadas directamente no local do tumor subcutâneo. IV - as células de HPP foram administradas intravenosamente. Controlo - apenas administração de veículo. Volumes de tumor em mm^3 .

5. DESCRIÇÃO DETALHADA

O presente invento refere-se a células de perfusato placentário nucleadas humanas para utilização num método para

tratamento de um tumor num indivíduo, onde as células de perfusato placentário nucleadas humanas compreendem células assassinas naturais intermédias placentárias CD56⁺, CD16⁻ e podem ser obtidas por perfusão de uma placenta humana que foi drenada de sangue de cordão umbilical e lavada para remover sangue residual para produzir perfusato placentário compreendendo células placentárias nucleadas; e isolamento das células placentárias nucleadas a partir do referido perfusato placentário.

O presente invento refere-se adicionalmente a células assassinas naturais intermédias placentárias CD56⁺, CD16⁻ humanas para utilização num método para tratamento de um tumor num indivíduo, onde as referidas células assassinas naturais intermédias placentárias exprimem um ou mais dos microARNs hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618 ou hsa-miR-99a a um nível detectavelmente mais elevado do que células assassinas naturais de sangue periférico.

Finalmente, o presente invento refere-se a células assassinas naturais combinadas para utilização num método de tratamento de um tumor num indivíduo, onde as referidas células assassinas naturais combinadas compreendem células assassinas naturais intermédias placentárias CD56⁺, CD16⁻ isoladas a partir de perfusato placentário e células assassinas naturais isoladas a partir de sangue do cordão umbilical e onde o referido sangue do cordão umbilical é isolado a partir da placenta a partir da qual o referido perfusato placentário é obtido, onde as referidas células assassinas naturais intermédias placentárias exprimem um ou mais dos microARNs hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618 ou hsa-miR-99a a um nível detectavelmente mais elevado do que células assassinas naturais de sangue periférico.

É aqui proporcionada a utilização de perfusato placentário, células de perfusato placentário e/ou células assassinas naturais derivadas de perfusato placentário ("PINK") obtidas a partir de placenta para suprimir o crescimento ou proliferação de uma célula tumoral ou pluralidade de células tumorais. Em particular, são aqui proporcionadas células assassinas naturais (NK) e populações de células NK, isoladas a partir de perfusato placentário, e.g., perfusato placentário humano, ou isoladas a partir de tecido placentário que foi quebrado mecanicamente e/ou enzimaticamente, métodos de obtenção das células NK, e métodos de utilização das células. São também aqui proporcionadas populações de células, e.g., populações de células placentárias, compreendendo células assassinas naturais. Na Secção 5.1, abaixo, descrevem-se métodos de obtenção de perfusato placentário e de obtenção de células a partir de perfusato placentário. Na Secção 5.2, abaixo descrevem-se células assassinas naturais derivadas de perfusato placentário e métodos de obtenção das células. Na Secção 5.3, abaixo, descrevem-se métodos de utilização do perfusato placentário, das células derivadas de perfusato placentário ou das células assassinas naturais derivadas de perfusato placentário, e.g., células assassinas naturais intermédias, para suprimir a proliferação de células tumorais.

5.1. Perfusato placentário

5.1.1. Composição da colheita de células

O perfusato placentário, as células de perfusato e as células assassinas naturais derivadas de perfusato placentário aqui proporcionados podem ser colhidos por perfusão de uma placenta pós-parto de mamífero, e.g., humano, utilizando uma composição de colheita de células placentárias. O perfusato pode ser colhido a partir da placenta por perfusão da placenta com qualquer solução fisiologicamente aceitável, e.g., uma solução salina, meio de cultura ou uma composição de colheita de células mais complexa. Uma composição de colheita de células adequada para perfusão de uma placenta, e para a colheita e preservação de células de perfusato, e.g., células de perfusato placentário nucleadas totais ou células PINK, é descrita em

detalhe na Publicação de Pedido de Patente dos E.U.A. relacionado N.º 2007/0190042.

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

A composição de colheita de células pode compreender um ou mais componentes que tendem a preservar as células placentárias, isto é, a evitar que as células placentárias morram, ou retardar a morte das células placentárias, reduzir o número de células placentárias numa população de células que morre, ou outra, desde o momento da colheita até ao momento da cultura. Estes componentes podem ser, e.g., um inibidor de apoptose (e.g., um inibidor de caspase ou um inibidor de JNK); um vasodilatador (e.g., sulfato de magnésio, um fármaco anti-hipertensor, péptido natriurético atrial (ANP), adrenocorticotropina, hormona de libertação de corticotropina, nitroprusseto de sódio, hidralazina, adenosina-trifosfato, adenosina, indometacina ou sulfato de magnésio, um inibidor de fosfodiesterase, etc.); um inibidor de necrose (e.g., 2-(1H-indol-3-il)-3-pentolamino-maleimida, ditiocarbamato de pirrolidina ou clonazepam); um inibidor de TNF- ; e/ou um perfluorocarboneto portador de oxigénio (e.g., brometo de perfluoro-octilo, brometo de perfluorodecilo, etc.).

A composição de colheita de células pode compreender uma ou mais enzimas de degradação de tecido, e.g., uma metaloprotease, uma serina-protease, uma protease neutra, uma hialuronidase, uma RNase ou uma DNase, ou outras. Estas enzimas incluem, mas não estão limitadas a, colagenases (e.g., colagenase I, II, III ou IV, uma colagenase a partir de *Clostridium histolyticum*, etc.); dispase, termolisina, elastase, tripsina, LIBERASE, hialuronidase, e outras.

A composição de colheita de células pode compreender uma quantidade bactericidamente ou bacteriostaticamente eficaz de um antibiótico. Em certas concretizações não limitantes, o

antibiótico é um macrólido (e.g., tobramicina), uma cefalosporina (e.g., cefalexina, cefradina, cefuroxima, cefprozil, cefaclor, cefixima ou cefadroxil), uma claritromicina, uma eritromicina, uma penicilina (e.g., penicilina V) ou uma quinolona (e.g., ofloxacina, ciprofloxacina ou norfloxacina), uma tetraciclina, uma estreptomicina, etc. Numa concretização particular, o antibiótico é activo contra bactérias Gram(+) e/ou Gram(-), e.g., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, e outras.

A composição de colheita de células pode também compreender um ou mais dos compostos seguintes: adenosina (cerca de 1 mM a cerca de 50 mM); D-glucose (cerca de 20 mM a cerca de 100 mM); iões magnésio (cerca de 1 mM a cerca de 50 mM); uma macromolécula de peso molecular superior a 20 000 dalton, numa concretização, presente numa quantidade suficiente para manter integridade endotelial e viabilidade celular (e.g., um colóide sintético ou de ocorrência natural, um polissacárido tal como dextrano ou um polietilenoglicol presentes em cerca de 25 g/l a cerca de 100 g/l, ou cerca de 40 g/l a cerca de 60 g/l); um antioxidante (e.g., hidroxianisole butilado, hidroxitolueno butilado, glutathione, vitamina C ou vitamina E presentes em cerca de 25 µM a cerca de 100 µM); um agente redutor (e.g., N-acetilcisteína presente em cerca de 0,1 mM a cerca de 5 mM); um agente que impede a entrada de cálcio nas células (e.g., verapamil presente em cerca de 2 µM a cerca de 25 µM); nitroglicerina (e.g., cerca de 0,05 g/L a cerca de 0,2 g/L); um anticoagulante, numa concretização, presente numa quantidade suficiente para ajudar a impedir a coagulação de sangue residual (e.g., heparina ou hirudina presentes numa concentração de cerca de 1000 unidades/l a cerca de 100 000 unidades/l); ou um composto contendo amilorida (e.g., amilorida, etil-isopropil-amilorida, hexametileno-amilorida, dimetil-amilorida ou isobutil-amilorida presentes em cerca de 1,0 µM a cerca de 5 µM).

5.1.2. Colheita e manipulação de placenta

Em geral, uma placenta humana é recuperada pouco depois da sua expulsão após o nascimento. Numa concretização preferida, a placenta é recuperada a partir de uma paciente após consentimento informado e após ser efectuada uma história

médica completa da paciente e associada à placenta. Preferivelmente, a história médica continua após o parto. Esta história médica pode ser utilizada para coordenar a utilização subsequente da placenta ou das células colhidas a partir da mesma. Por exemplo, células placentárias humanas podem ser utilizadas, à luz da história médica, para medicina personalizada para o bebé associado à placenta, ou para os pais, irmãos ou outros parentes do bebé.

Antes de recuperar o perfusato, removem-se o sangue do cordão umbilical e o sangue placentário. Em certas concretizações, após o parto, é recuperado o sangue do cordão na placenta. A placenta pode ser submetida a um processo de recuperação convencional do sangue do cordão. Tipicamente utiliza-se uma agulha ou cânula, com o auxílio da gravidade, para sangrar a placenta (ver, e.g., Anderson, Patente dos E.U.A. N.º 5 372 581; Hessel et al., Patente dos E.U.A. N.º 5 415 665). A agulha ou cânula é colocada usualmente na veia umbilical e a placenta pode ser gentilmente massajada para ajudar a drenar o sangue de cordão a partir da placenta. Esta recuperação de sangue de cordão pode ser realizada comercialmente, e.g., LifeBank Inc., Cedar Knolls, N.J., ViaCord, Cord Blood Registry and CryoCell. Preferivelmente, a placenta é drenada por gravidade sem manipulação adicional de modo a minimizar a disrupção de tecido durante a recuperação de sangue de cordão.

Tipicamente, uma placenta é transportada desde a sala de partos ou nascimentos para outra localização, e.g., um laboratório, para recuperação de sangue de cordão e colheita de perfusato. A placenta é preferivelmente transportada num dispositivo de transporte isolado termicamente, estéril (mantendo a temperatura da placenta entre 20-28°C), por exemplo, colocando a placenta, com o cordão umbilical proximal pinçado, num saco de plástico com fecho de correr, estéril, que é depois colocado num recipiente isolado. Noutra concretização, a placenta é transportada num kit de colheita de sangue de cordão substancialmente como descrito na Patente dos E.U.A. N.º 7 147 626. Preferivelmente, a placenta é entregue ao laboratório quatro a vinte e quatro horas após parto. Em certas concretizações, o cordão umbilical proximal é pinçado, preferivelmente a menos de 4-5 cm (centímetros) da

inserção no disco placentário antes da recuperação do sangue de cordão. Noutras concretizações, o cordão umbilical proximal é pinçado após recuperação do sangue de cordão mas antes do processamento adicional da placenta.

Antes da colheita do perfusato, a placenta pode ser armazenada sob condições estéreis e quer à temperatura ambiente quer a uma temperatura de 5 a 25°C (centígrados). A placenta pode ser armazenada por um período de mais de quarenta e oito horas, e preferivelmente por um período de quatro a vinte e quatro horas antes de perfundir a placenta para remover qualquer sangue de cordão residual. A placenta é preferivelmente armazenada numa solução anticoagulante a uma temperatura de 5°C a 25°C (centígrados). Soluções anticoagulantes adequadas são bem conhecidas na especialidade. Por exemplo, pode-se utilizar uma solução de heparina ou varfarina sódica. Numa concretização preferida, a solução anticoagulante compreende uma solução de heparina (e.g., 1% p/p em solução 1:1000). A placenta sangrada é preferivelmente armazenada por não mais de 36 horas antes de se colher o perfusato placentário.

5.1.3. Perfusão placentária

Métodos de perfusão de placentas de mamífero são reveladas, e.g., em Hariri, Patentes dos E.U.A. N.ºs 7 045 148 e 7 255 879, e Publicação do Pedido de Patente dos E.U.A. N.º 2007/0190042, intitulada "Improved Composition for Collecting and Preserving Organs".

O perfusato pode ser obtido por passagem de solução de perfusão, e.g., solução salina, meio de cultura ou composições de colheita de células descritas acima, através da vasculatura placentária. Numa concretização, uma placenta de mamífero é perfundida por passagem de solução de perfusão através de qualquer ou de ambas da artéria umbilical e veia umbilical. O fluxo de solução de perfusão através da placenta pode ser conseguido utilizando, e.g., fluxo por gravidade dentro da placenta. Preferivelmente, a solução de perfusão é forçada através da placenta utilizando uma bomba, e.g., uma bomba peristáltica. A veia umbilical pode ser, e.g., canulada com uma cânula, e.g., uma cânula de TEFLON® ou plástico, que está

ligada a um dispositivo de conexão estéril, tal como uma tubagem estéril. O dispositivo de conexão estéril está ligado a uma tubagem de perfusão.

Na preparação para perfusão, a placenta é preferivelmente orientada de um modo tal que a artéria umbilical e a veia umbilical estão localizadas no ponto mais elevado da placenta. A placenta pode ser perfundida por passagem de uma solução de perfusão através da vasculatura placentária, ou através da vasculatura placentária e tecido envolvente. Numa concretização, a artéria umbilical e a veia umbilical são ligadas simultaneamente a uma pipeta que está ligada através de um conector flexível a um reservatório da solução de perfusão. Faz-se passar a solução de perfusão no interior da veia e artéria umbilical. A solução de perfusão exsuda a partir de e/ou passa através das paredes dos vasos sanguíneos para os tecidos envolventes da placenta, e é colhida num vaso aberto adequado a partir da superfície da placenta que estava ligada ao útero da mãe durante a gestação. A solução de perfusão pode também ser introduzida através a abertura do cordão umbilical e deixada fluir ou percolar através das aberturas na parede da placenta que faz a interface com a parede uterina materna. Noutra concretização, faz-se passar a solução de perfusão através das veias umbilicais e colhe-se a partir da artéria umbilical, ou faz-se passar através da artéria umbilical e colhe-se a partir das veias umbilicais, isto é, faz-se passar apenas através da vasculatura placentária (tecido fetal).

Numa concretização, por exemplo, a artéria umbilical e a veia umbilical estão ligadas simultaneamente, *e.g.*, a uma pipeta que está ligada através de um conector flexível a um reservatório da solução de perfusão. Faz-se passar a solução de perfusão no interior da veia e artéria umbilical. A solução de perfusão exsuda a partir de e/ou passa através das paredes dos vasos sanguíneos para os tecidos envolventes da placenta, e é colhida num vaso aberto adequado a partir da superfície da placenta que estava ligada ao útero da mãe durante a gestação. A solução de perfusão pode também ser introduzida através a abertura do cordão umbilical e deixada fluir ou percolar através das aberturas na parede da placenta que faz a interface com a parede uterina materna. As células placentárias que são colhidas por este método, que pode ser referido como um método

de "panela", são tipicamente uma mistura de células fetais e maternas.

Noutra concretização, faz-se passar a solução de perfusão através das veias umbilicais e colhe-se a partir da artéria umbilical, ou faz-se passar através da artéria umbilical e colhe-se a partir das veias umbilicais. As células placentárias colhidas por este método, que pode ser referido como um método em "circuito fechado", são tipicamente quase exclusivamente fetais.

O método de perfusão em circuito fechado, numa concretização, pode ser realizado como se segue. Obtém-se uma placenta pós-parto no prazo de 48 horas após o nascimento. O cordão umbilical é pinçado e cortado acima da pinça. O cordão umbilical pode ser rejeitado, ou pode ser processado para recuperar, e.g., células estaminais de cordão umbilical, e/ou para processar a membrana de cordão umbilical para a produção de um biomaterial. A membrana amniótica pode ser mantida durante a perfusão, ou pode ser separada do córion, por exemplo, utilizando uma dissecação sem corte com os dedos. Se a membrana amniótica é separada do córion antes da perfusão, esta pode ser, e.g., rejeitada ou processada, e.g., para obter células estaminais por digestão enzimática, ou para produzir, e.g., um biomaterial de membrana amniótica, e.g., o biomaterial descrito na Publicação do Pedido de Patente dos E.U.A. N.º 2004/0048796. Após limpar a placenta de todos os coágulos de sangue visíveis e de sangue residual, e.g., utilizando gaze estéril, expõem-se os vasos do cordão umbilical, e.g., cortando parcialmente a membrana do cordão umbilical para expor uma secção transversal do cordão. Identificam-se os vasos e abrem-se, e.g., fazendo avançar uma pinça tipo crocodilo fechada através da extremidade cortada de cada vaso. A aparelhagem, e.g., tubagem plástica ligada a um dispositivo de perfusão ou bomba peristáltica, é depois inserida em cada uma das artérias placentárias. A bomba pode ser qualquer bomba adequada para o propósito, e.g., uma bomba peristáltica. A tubagem plástica, ligada a um reservatório de colheita estéril, e.g., um saco de sangue tal como um saco de colheita de 250 mL, é depois inserida na veia placentária. Alternativamente, a tubagem ligada à bomba é inserida na veia placentária, e tubos ligados a um ou mais reservatórios de colheita são inseridos em uma ou em ambas as

artérias placentárias. A placenta é depois perfundida com um volume de solução de perfusão, e.g., cerca de 750 ml de solução de perfusão. Colhem-se depois as células no perfusato, e.g., por centrifugação.

Numa concretização, o cordão umbilical proximal está pinçado durante a perfusão e, mais preferivelmente, está pinçado a menos de 4-5 cm (centímetro) da inserção do cordão no disco placentário.

A primeira colheita de fluido de perfusão a partir de uma placenta de mamífero durante o processo de exsanguinação está geralmente colorida com glóbulos vermelhos residuais do sangue de cordão e/ou sangue placentário. O fluido de perfusão torna-se mais descolorido à medida que a perfusão prossegue e as células residuais de sangue de cordão umbilical são lavadas da placenta. Em geral de 30 a 100 mL de fluido de perfusão são adequados para lavar inicialmente o sangue da placenta, mas pode-se utilizar mais ou menos fluido de perfusão dependendo dos resultados observados.

O volume de líquido de perfusão utilizado para perfundir a placenta pode variar dependendo do número de células placentárias a serem colhidas, do tamanho da placenta, do número de colheitas a serem efectuadas a partir de uma única placenta, etc. Em várias concretizações, o volume de líquido de perfusão pode ser de 50 mL a 5000 mL, 50 mL a 4000 mL, 50 mL a 3000 mL, 100 mL a 2000 mL, 250 mL a 2000 mL, 500 mL a 2000 mL, ou 750 mL a 2000 mL. Tipicamente, a placenta é perfundida com 700-800 mL de líquido de perfusão após exsanguinação.

A placenta pode ser perfundida uma pluralidade de vezes no decorrer de várias horas ou vários dias. Quando se pretende perfundir a placenta uma pluralidade de vezes, esta pode ser mantida ou cultivada sob condições assépticas num recipiente ou noutro vaso adequado, e perfundida com uma composição de colheita de células, ou uma solução de perfusão padrão (e.g., uma solução salina normal tal como solução salina tamponada com fosfato ("PBS") com ou sem um anticoagulante (e.g., heparina, varfarina sódica, cumarina, bis-hidroxicumarina), e/ou com ou sem um agente antimicrobiano (e.g., -

mercaptoetanol (0,1 mM); antibióticos tais como estreptomicina (e.g., a 40-100 µg/ml), penicilina (e.g., a 40 U/ml), anfotericina B (e.g., a 0,5 µg/ml). Numa concretização, uma placenta isolada é mantida ou cultivada por um período de tempo sem colheita do perfusato, tal que a placenta é mantida ou cultivada durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24 horas, ou 2 ou 3 ou mais dias antes da perfusão e colheita de perfusato. A placenta perfundida pode ser mantida durante um ou mais períodos adicionais, e.g., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou mais horas, e perfundida uma segunda vez com, e.g., 700-800 mL de fluido de perfusão. A placenta pode ser perfundida 1, 2, 3, 4, 5 ou mais vezes, por exemplo, uma vez a cada 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 horas. Numa concretização preferida, a perfusão da placenta e a colheita de solução de perfusão, e.g., composição de colheita de células placentárias, é repetida até o número de células nucleadas recuperadas cair para menos de 100 células/ml. Os perfusatos para diferentes pontos temporais podem ainda ser processados individualmente para recuperar populações de células dependentes do tempo, e.g., células nucleadas totais. Podem-se também reunir perfusatos obtidos para diferentes pontos temporais.

5.1.4. Perfusato placentário e células de perfusato placentário

O perfusato placentário compreende uma colheita heterogénea de células. Tipicamente, o perfusato placentário é desprovido de eritrócitos antes do uso. Esta depleção pode ser realizada por métodos conhecidos de separação de glóbulos vermelhos de células sanguíneas nucleadas. Em certa concretização, o perfusato ou células de perfusato são criopreservados. Em certas outras concretizações, o perfusato placentário compreende, ou as células de perfusato compreendem, apenas células fetais, ou uma combinação de células fetais e células maternas.

Tipicamente, o perfusato placentário a partir de uma única perfusão placentária compreende cerca de 100 milhões a cerca de 500 milhões de células nucleadas. Em certas concretizações, o perfusato placentário ou células de perfusato compreendem

células CD34⁺, e.g., células progenitoras ou estaminais hematopoiéticas. Numa concretização mais específica, estas células podem compreender células progenitoras ou estaminais CD34⁺CD45⁻, células progenitoras ou estaminais CD34⁺CD45⁺, progenitoras mielóides, progenitoras linfóides e/ou progenitoras eritróides. Noutras concretizações, o perfusato placentário e células de perfusato placentário compreendem células estaminais placentárias aderentes, e.g., células estaminais CD34⁻. Noutra concretização, o perfusato placentário e células de perfusato placentário compreendem, e.g., células progenitoras endoteliais, células osteoprogenitoras e células assassinas naturais. Em certas concretizações, o perfusato placentário conforme colhido a partir da placenta e desprovido de eritrócitos, ou células de perfusato isoladas a partir deste perfusato, compreendem cerca de 6-7% de células assassinas naturais (CD3⁻, CD56⁺); cerca de 21-22% de células T (CD3⁺); cerca de 6-7% de células B (CD19⁺); cerca de 1-2% de células progenitoras endoteliais (CD34⁺, CD31⁺); cerca de 2-3% de células progenitoras neurais (nestina⁺); cerca de 2-5% de células progenitoras hematopoiéticas (CD34⁺); e cerca de 0,5-1,5% de células estaminais placentárias aderentes (e.g., CD34⁻, CD117⁻, CD105⁺ e CD44⁺), conforme determinado, e.g. por citometria de fluxo, e.g., por análise FACS.

5.2. Disrupção e digestão de tecido placentário para obter células PINK

Podem-se obter células assassinas naturais placentárias, e.g., células PINK, a partir de tecido placentário que foi quebrado mecanicamente e/ou enzimaticamente.

O tecido placentário pode ser quebrado utilizando uma ou mais enzimas de degradação de tecido, e.g., uma metaloprotease, uma serina-protease, uma protease neutra, um RNase ou uma DNase, ou outra. Estas enzimas incluem, mas não estão limitadas a, colagenases (e.g., colagenase I, II, III ou IV, uma colagenase a partir de *Clostridium histolyticum*, etc.); dispase, termolisina, elastase, tripsina, LIBERASE, hialuronidase, e outras. Tipicamente após digestão, faz-se passar o tecido digerido através de um coador ou filtro para remover aglomerados de células parcialmente digeridos,

deixando uma suspensão de células substancialmente individuais.

Após se obter uma suspensão de células placentárias, podem-se isolar células assassinas naturais utilizando, *e.g.*, anticorpos para CD3 e CD56. Numa concretização específica, células assassinas naturais placentárias são isoladas por selecção de células que são CD56⁺ para produzir uma primeira população de células; contacto da referida primeira população de células com anticorpos específicos para CD3 e/ou CD16; e remoção das células a partir da referida primeira população de células que são CD3⁺ ou CD56⁺, produzindo desse modo uma segunda população de células que é substancialmente CD56⁺ e CD3⁻, CD56⁺ e CD16⁻, ou CD56⁺, CD3⁻ e CD16⁻.

Numa concretização, utilizam-se pérolas magnéticas para isolar células assassinas naturais placentárias a partir de uma suspensão de células placentárias. As células podem ser isoladas, *e.g.*, utilizando uma técnica de separação de células activadas magnéticas (MACS, *magnetic activated cell sorting*), um método para separar partículas com base na sua capacidade para se ligarem a pérolas magnéticas (*e.g.*, cerca de 0,5-100 µm de diâmetro) que compreendem um ou mais anticorpos específicos, *e.g.*, anticorpos anti-CD56. Podem-se realizar várias modificações úteis sobre as microesferas magnéticas, incluindo adição covalente de anticorpo que especificamente reconhece uma molécula na superfície celular ou hapteno particular. Misturam-se depois pérolas com as células para permitir a ligação. Fazem-se depois passar as células através de um campo magnético para separar as células possuindo o marcador de superfície celular específico. Numa concretização, estas células podem depois ser isoladas e remisturadas com pérolas magnéticas acopladas a um anticorpo contra marcadores de superfície celular adicionais. Fazem-se depois passar as células através de um campo magnético, isolando as células que se ligam a ambos os anticorpos. Estas células podem então ser diluídas em placas separadas, tais como placas de microtitulação para isolamento clonal.

5.3. Células assassinas naturais placentárias

Num aspecto, é aqui proporcionado o isolamento, caracterização e utilização de células assassinas naturais que podem ser obtidas a partir de placenta, e.g., a partir de perfusato placentário e/ou a partir de tecido placentário quebrado mecanicamente e/ou enzimaticamente, e de composições compreendendo estas células assassinas naturais. Numa concretização específica, as células assassinas naturais placentárias são "células assassinas naturais intermédias placentárias", ou células "PINK", são caracterizadas como sendo $CD56^+CD16^-$, i.e., exibindo o marcador celular CD56 e com ausência do marcador celular CD16, e.g., como determinado por citometria de fluxo, e.g., separação de células activadas por fluorescência utilizando anticorpos contra CD16 e CD56, como descrito acima. Como tal, são aqui proporcionadas células PINK isoladas e pluralidades de células PINK isoladas. São também aqui proporcionadas pluralidades de células isoladas compreendendo células $CD56^+CD16^-$ em combinação com células assassinas naturais $CD56^+CD16^+$. Em concretizações mais específicas, as células assassinas naturais $CD56^+CD16^+$ podem ser isoladas a partir de placenta, ou a partir de outra origem, e.g., sangue periférico, sangue do cordão umbilical, medula óssea, ou outras. Assim, em várias outras concretizações, células PINK podem ser combinadas com células assassinas naturais $CD56^+CD16^+$, e.g., em proporções de, por exemplo, cerca de 1:10, 2:9, 3:8, 4:7, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 ou cerca de 9:1. Como utilizado neste contexto, "isoladas" significa que as células foram removidas do seu ambiente normal, e.g., a placenta.

Em certas concretizações, as células PINK são $CD3^-$.

Noutras concretizações, as células PINK não exibem um ou mais marcadores celulares exibidos por células assassinas naturais totalmente maduras (e.g., CD16), ou exibem estes um ou mais marcadores a um nível detectavelmente reduzido em comparação com células assassinas naturais totalmente maduras, ou exibem um ou mais marcadores celulares associados a precursores de células assassinas naturais mas não a células assassinas naturais totalmente maduras. Numa concretização

específica, uma célula PINK aqui proporcionada exprime NKG2D, CD94 e/ou NKp46 a um nível detectavelmente mais baixo do que uma célula NK totalmente madura. Noutra concretização específica, uma pluralidade de células PINK aqui proporcionadas expressa, no total, NKG2D, CD94 e/ou NKp46 a um nível detectavelmente mais baixo do que um número equivalente de células NK totalmente maduras.

Em certas concretizações, as células PINK exprimem um ou mais dos microARNs hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618, e/ou hsa-miR-99a a um nível detectavelmente mais elevado do que células assassinas naturais de sangue periférico.

Em certas concretizações, as células assassinas naturais placentárias, e.g., células PINK, foram expandidas em cultura. Em certas outras concretizações, as células de perfusato placentário foram expandidas em cultura. Numa concretização específica, as referidas células de perfusato placentário foram expandidas na presença de uma camada alimentadora e/ou na presença de pelo menos uma citoquina. Numa concretização mais específica, a referida camada alimentadora compreende células K562 ou células mononucleares de sangue periférico. Noutra concretização mais específica, a referida pelo menos uma citoquina é interleucina-2.

Noutra concretização, é aqui proporcionada uma pluralidade (e.g., população) de células PINK isoladas. Noutra concretização específica, a população de células isoladas é produzida por isolamento de células por micropérolas de CD56 a partir de perfusato placentário. Em várias concretizações específicas, a população compreende pelo menos cerca de 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou pelo menos cerca de 99% de células PINK. Noutra concretização, a pluralidade de células PINK compreende, ou consiste de, células PINK que não foram expandidas; e.g., são conforme colhidas a partir de perfusato placentário. Noutra concretização, a pluralidade de células PINK compreende, ou consiste de, células PINK que foram expandidas. Métodos de expansão de células

assassininas naturais foram descritos, *e.g.*, em Ohno *et al.*, Publicação do Pedido de Patente dos E.U.A. N.º 2003/0157713; ver também Yssel *et al.*, *J. Immunol. Methods* 72(1):219-227 (1984) e Litwin *et al.*, *J. Exp. Med.* 178(4):1321-1326 (1993) e a descrição da expansão de células assassinas naturais no Exemplo 1, abaixo.

Noutras concretizações, a pluralidade de células PINK isoladas não exibe um ou mais marcadores celulares exibidos por células assassinas naturais totalmente maduras (*e.g.*, CD16), ou exibe estes um ou mais marcadores a um nível detectavelmente reduzido em comparação com células assassinas naturais totalmente maduras, ou exibe um ou mais marcadores celulares associados a precursores de células assassinas naturais mas não associados a células assassinas naturais totalmente maduras. Numa concretização específica, uma célula PINK aqui proporcionada exprime NKG2D, CD94 e/ou NKp46 a um nível detectavelmente mais baixo do que uma célula NK totalmente madura. Noutra concretização específica, uma pluralidade de células PINK aqui proporcionada exprime, no total, NKG2D, CD94 e/ou NKp46 a um nível detectavelmente mais baixo do que um número equivalente de células NK totalmente maduras.

Em certas concretizações específicas, a população de células PINK exprime um ou mais dos microARNs hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618 e/ou hsa-miR-99a a um nível detectavelmente mais elevado do que células assassinas naturais de sangue periférico. Noutra concretização específica, a população de células PINK exprime uma quantidade detectavelmente mais elevada de granzima B do que um número equivalente de células assassinas naturais de sangue periférico.

Noutras concretizações, as células PINK aqui proporcionadas foram expandidas em cultura. Em concretizações específicas, as células PINK foram cultivadas, *e.g.*, expandidas em cultura, durante pelo menos, cerca de, ou no máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,

17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 dias. Numa concretização específica, as células PINK são cultivadas durante cerca de 21 dias.

Noutra concretização, é aqui proporcionada uma população de células isoladas, e.g., células placentárias, compreendendo células PINK. Numa concretização específica, a população de células isoladas é constituída de células nucleadas totais a partir de perfusato placentário, e.g., células de perfusato placentário, compreendendo células PINK isoladas, autólogas. Noutra concretização específica, a população de células é uma população de células isoladas produzida por isolamento de células por micropérolas de CD56 a partir de perfusato placentário. Em várias concretizações específicas, a população compreende pelo menos cerca de 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou pelo menos cerca de 99% células PINK.

Porque a placenta pós-parto compreende tecidos e células a partir do feto e a partir do perfusato placentário da mãe, dependendo do método de colheita, pode compreender apenas células fetais, ou uma maioria substancial de células fetais (e.g., mais de cerca de 90%, 95%, 98% ou 99%), ou pode compreender uma mistura de células fetais e maternas (e.g., as células fetais compreendem menos do que cerca de 90%, 80%, 70%, 60% ou 50% das células nucleadas totais do perfusato). Numa concretização, as células PINK são obtidas apenas a partir de células placentárias fetais, e.g., células obtidas a partir de perfusão da placenta em circuito fechado (ver acima) onde a perfusão produz perfusato compreendendo uma maioria substancial de, ou apenas, células placentárias fetais. Noutra concretização, as células PINK são obtidas a partir de células fetais e maternas, e.g., células obtidas por perfusão pelo método de panela (ver acima), onde a perfusão produziu perfusato compreendendo uma mistura de células placentárias fetais e maternas. Assim, numa concretização, é aqui proporcionada uma população de células assassinas naturais intermédias derivadas de placenta, a maioria substancial das quais tem o genótipo fetal. Noutra concretização, é aqui proporcionada uma população de células assassinas naturais intermédias derivadas de placenta que compreendem células

assassininas naturais possuindo o genótipo fetal e células assassinas naturais possuindo o fenótipo maternal.

São também aqui proporcionadas populações de células assassinas naturais intermédias derivadas de placenta que compreendem células assassinas naturais a partir de uma origem não placentária. Por exemplo, numa concretização, é aqui proporcionada uma população de células PINK que também compreende células assassinas naturais a partir de sangue do cordão umbilical, sangue periférico, medula óssea, ou uma combinação de dois ou mais das anteriores. As populações de células assassinas naturais compreendendo células PINK e células assassinas naturais a partir de uma origem não placentária podem compreender as células, e.g., numa proporção de cerca de 1:10, 2:9, 3:8, 4:7, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, 10:1, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, ou cerca de 1:100, ou outras.

Adicionalmente são aqui proporcionadas combinações de sangue do cordão umbilical e células PINK. Em várias concretizações, sangue de cordão é combinado com células PINK com cerca de 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 ou 5×10^8 , ou mais, células PINK por mililitro de sangue de cordão.

São também aqui proporcionados métodos de isolamento de células PINK. Numa concretização, células PINK são colhidas por obtenção de perfusato placentário, depois contacto do perfusato placentário com uma composição que especificamente se liga a células CD56⁺, e.g., um anticorpo contra CD56, seguido por isolamento de células CD56⁺ com base na referida ligação para formar uma população de células CD56⁺. A população de células CD56⁺ compreende uma população de células assassinas naturais isoladas. Numa concretização específica, células CD56⁺ são postas em contacto com uma composição que

especificamente se liga a células CD16⁺, e.g., um anticorpo contra CD16, e as células CD16⁺ a partir da população de células CD56⁺. Noutra concretização específica, células CD3⁺ são também excluídas da população de células CD56⁺.

Numa concretização, as células PINK são obtidas a partir de perfusato placentário como se segue. Placenta humana pós-parto é sangrada e perfundida, e.g., com cerca de 200-800 mL de solução de perfusão, apenas através da vasculatura placentária. Numa concretização específica, a placenta é drenada de sangue de cordão e lavada, e.g., com solução de perfusão, através da vasculatura placentária para remover sangue residual antes da referida perfusão. O perfusato é colhido e processado para remover quaisquer eritrócitos residuais. As células assassinas naturais nas células nucleadas totais no perfusato podem ser isoladas com base na expressão de CD56 e CD16. Em certas concretizações, o isolamento de células PINK compreende isolamento utilizando um anticorpo para CD56, onde as células isoladas são CD56⁺. Noutra concretização, o isolamento de células PINK compreende isolamento utilizando um anticorpo para CD16, onde as células isoladas são CD16⁻. Noutra concretização, o isolamento de células PINK compreende isolamento utilizando um anticorpo para CD56, e exclusão de uma pluralidade de células não PINK utilizando um anticorpo para CD16, onde as células isoladas compreendem células CD56⁺, CD16⁻.

A separação de células pode ser efectuada por qualquer método conhecido na especialidade, e.g., separação de células activadas por fluorescência (FACS), ou, preferivelmente, separação magnética de células utilizando micropérolas conjugadas com anticorpos específicos. A separação magnética de células pode ser realizada e automatizada utilizando, e.g., um separador AUTOMACS™ (Miltenyi).

Noutro aspecto, é aqui proporcionado um método de isolamento de células assassinas naturais placentárias, compreendendo obtenção de uma pluralidade de células placentárias, e isolamento de células assassinas naturais a partir da referida pluralidade de células placentárias. Numa concretização específica, as células placentárias são, ou compreendem, células de perfusato placentário, e.g., células

nucleadas totais a partir de perfusato placentário. Noutra concretização específica, a referida pluralidade de células placentárias são, ou compreendem, células placentárias obtidas por digestão mecânica e/ou enzimática de tecido placentário. Noutra concretização, o referido isolamento é realizado utilizando um ou mais anticorpos. Numa concretização mais específica, o referido um ou mais anticorpos compreendem um ou mais anticorpos para CD3, CD16 ou CD56. Numa concretização mais específica, o referido isolamento compreende isolamento de células CD56⁺ de células CD56⁻ na referida pluralidade de células placentárias. Numa concretização mais específica, o referido isolamento compreende isolamento de células placentárias CD56⁺, CD16⁻, e.g., células assassinas naturais placentárias, e.g., células PINK, de células placentárias que são CD56⁻ ou CD16⁺. Numa concretização mais específica, o referido isolamento compreende isolamento de células placentárias CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻ de células placentárias que são CD56⁻, CD16⁺ ou CD3⁺. Noutra concretização, o referido método de isolamento de células assassinas naturais placentárias resulta numa população de células placentárias que é pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou pelo menos 99% de células assassinas naturais CD56⁺, CD16⁻.

5.4. Células assassinas naturais placentárias a partir de perfusato e sangue de cordão correspondentes

Adicionalmente são aqui proporcionadas células assassinas naturais obtidas, e que podem ser obtidas, a partir de combinações de unidades de perfusato placentário e sangue do cordão umbilical correspondentes, aqui referidas como células assassinas naturais combinadas. "Unidades correspondentes", como aqui utilizado, indica que as células NK são obtidas a partir de células de perfusato placentário e de células de sangue do cordão umbilical, onde as células de sangue do cordão umbilical são obtidas a partir de sangue do cordão umbilical a partir da placenta a partir da qual o perfusato placentário é obtido, i.e., as células de perfusato placentário e as células de sangue do cordão umbilical, e assim as células assassinas naturais de cada, são do mesmo indivíduo.

Em certas concretizações, as células assassinas placentárias combinadas compreendem apenas, ou

substancialmente apenas, células assassinas naturais que são CD56⁺ e CD16⁻. Em certas outras concretizações, as células assassinas placentárias combinadas compreendem células NK que são CD56⁺ e CD16⁻, e células NK que são CD56⁺ e CD16⁺. Em certas concretizações específicas, as células assassinas placentárias combinadas compreendem pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 99,5% de células assassinas naturais CD56⁺CD16⁻ (células PINK).

Numa concretização, as células assassinas naturais combinadas não foram cultivadas. Numa concretização específica, as células assassinas naturais combinadas compreendem um número detectavelmente mais elevado de células assassinas naturais CD3⁻CD56⁺CD16⁻ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico. Noutra concretização específica, as células assassinas naturais combinadas compreendem um número detectavelmente mais baixo de células assassinas naturais CD3⁻CD56⁺CD16⁻ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico. Noutra concretização específica, as células assassinas naturais combinadas compreendem um número detectavelmente mais elevado de células assassinas naturais CD3⁻CD56⁺KIR2DL2/L3⁺ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico. Noutra concretização específica, as células assassinas naturais combinadas compreendem um número detectavelmente mais baixo de células assassinas naturais CD3⁻CD56⁺NKp46⁺ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico. Noutra concretização específica, as células assassinas naturais combinadas compreendem um número detectavelmente mais baixo de células assassinas naturais CD3⁻CD56⁺NKp30⁺ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico. Noutra concretização específica, as células assassinas naturais combinadas compreendem um número detectavelmente mais baixo de células assassinas naturais CD3⁻CD56⁺2B4⁺ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico. Noutra concretização específica, as células assassinas naturais combinadas compreendem um número detectavelmente mais baixo de células assassinas naturais CD3⁻CD56⁺CD94⁺ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico.

Noutra concretização, as células assassinas naturais combinadas foram cultivadas, *e.g.*, durante 21 dias. Numa concretização específica, as células assassinas naturais combinadas compreendem um número detectavelmente mais baixo de células assassinas naturais CD3⁻CD56⁺KIR2DL2/L3⁺ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico. Noutra concretização específica, as células assassinas naturais combinadas não foram cultivadas. Noutra concretização específica, as células assassinas naturais combinadas compreendem um número detectavelmente mais elevado de células assassinas naturais CD3⁻CD56⁺NKp44⁺ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico. Numa concretização específica, as células assassinas naturais combinadas compreendem um número detectavelmente mais elevado de células assassinas naturais CD3⁻CD56⁺NKp30⁺ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico.

Noutra concretização, as células assassinas naturais combinadas exprimem uma quantidade detectavelmente mais elevada de granzima B do que um número equivalente de células assassinas naturais de sangue periférico.

Adicionalmente são aqui proporcionadas combinações de sangue do cordão umbilical e células assassinas naturais combinadas. Em várias concretizações, sangue de cordão está combinado com células assassinas naturais combinadas com cerca de 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 células assassinas naturais combinadas por mililitro de sangue de cordão.

5.5. Combinações de perfusato/células

Para além de perfusato placentário, células de perfusato placentário, células assassinas naturais combinadas e células assassinas naturais placentárias, *e.g.*, células assassinas naturais intermédias placentárias, são aqui proporcionadas composições compreendendo o perfusato ou células, para utilização na supressão da proliferação de uma célula tumoral ou pluralidade de células tumorais.

5.5.1. Combinações de perfusato placentário, células de perfusato e células assassinas naturais intermédias derivadas de placenta

Adicionalmente são aqui proporcionadas composições compreendendo combinações do perfusato placentário, células de perfusato placentário, células assassinas naturais intermédias placentárias, e/ou células assassinas naturais combinadas descritas nas Secções 5.1, 5.3 ou 5.4 acima. Numa concretização, por exemplo, é aqui proporcionado um volume de perfusato placentário suplementado com uma pluralidade de células de perfusato placentário e/ou uma pluralidade de células assassinas naturais placentárias, e.g., células assassinas naturais intermédias placentárias, por exemplo, obtidas a partir de células de perfusato placentário ou tecido placentário quebrado mecanicamente ou enzimaticamente. Em concretizações específicas, por exemplo, cada mililitro de perfusato placentário está suplementado com cerca de 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^1 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 ou mais células de perfusato placentário, células assassinas naturais intermédias placentárias e/ou células assassinas naturais combinadas. Noutra concretização, uma pluralidade de células de perfusato placentário está suplementada com perfusato placentário, células assassinas naturais intermédias placentárias e/ou células assassinas naturais combinadas. Noutra concretização, uma pluralidade de células assassinas naturais intermédias placentárias está suplementada com perfusato placentário, células de perfusato placentário e/ou células assassinas naturais combinadas. Em certas concretizações, quando se utiliza perfusato para suplementação, o volume de perfusato é cerca de, maior do que cerca de, ou menor do que cerca de, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% ou 1% do volume total de células (em solução) mais perfusato. Em certas outras concretizações, quando células de perfusato placentário são combinadas com uma pluralidade de células PINK e/ou células assassinas naturais combinadas, as células de perfusato placentário compreendem geralmente cerca de, mais do que cerca de, ou menos do que cerca de, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% ou 1% do número total de células. Em certas outras concretizações, quando células PINK são combinadas com uma pluralidade de células de perfusato

placentário e/ou células assassinas naturais combinadas, as células PINK compreendem geralmente cerca de, mais do que cerca de, ou menos do que cerca de, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% ou 1% do número total de células. Em certas outras concretizações, quando células assassinas naturais combinadas são combinadas com células PINK e/ou células de perfusato placentário, as células assassinas naturais combinadas compreendem geralmente cerca de, mais do que cerca de, ou menos do que cerca de, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% ou 1% do número total de células. Em certas outras concretizações, quando se utilizam células PINK, células assassinas naturais combinadas ou células de perfusato placentário para suplementar perfusato placentário, o volume de solução (e.g., solução salina, meio de cultura ou outro) no qual as células são suspensas compreende cerca de, mais do que cerca de, ou menos do que cerca de, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% ou 1% do volume total de perfusato mais células, onde as células PINK são suspensas com cerca de 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 ou mais células por mililitro antes da suplementação.

Noutras concretizações, qualquer das combinações anteriores é, por sua vez, combinada com sangue do cordão umbilical ou células nucleadas a partir de sangue do cordão umbilical.

Adicionalmente é aqui proporcionado perfusato placentário reunido que é obtido a partir de duas ou mais origens, e.g., duas ou mais placentas, e combinado, e.g., reunido. Este perfusato reunido pode compreender volumes aproximadamente iguais de perfusato a partir de cada origem, ou pode compreender volumes diferentes a partir de cada origem. Os volumes relativos a partir de cada origem podem ser seleccionados aleatoriamente ou podem ser baseados e.g., numa concentração ou quantidade de um ou mais factores celulares, e.g., citoquinas, factores de crescimento, hormonas, ou outros; no número de células placentárias no perfusato a partir de cada origem; ou noutras características do perfusato a partir de cada origem. Similarmente pode-se reunir perfusato a partir de múltiplas perfusões da mesma placenta.

Similarmente, são aqui proporcionadas células de perfusato placentário e células assassinas naturais intermédias derivadas de placenta, que são obtidas a partir de duas ou mais origens, *e.g.*, duas ou mais placentas, e reunidas. Estas células reunidas podem compreender números de células aproximadamente iguais a partir das duas ou mais origens, ou números de células diferentes a partir de uma ou mais das origens reunidas. Os números relativos de células a partir de cada origem podem ser seleccionados com base, *e.g.*, no número de um ou mais tipos de células específicos nas células a serem reunidas, *e.g.*, o número de células CD34⁺, o número de células CD56⁺, *etc.*

As fracções reunidas podem compreender, *e.g.*, perfusato placentário suplementado com células de perfusato placentário; perfusato placentário suplementado com células assassinas naturais intermédias (PINK) derivadas de placenta; perfusato placentário suplementado tanto com células de perfusato placentário como com células PINK; células de perfusato placentário suplementadas com perfusato placentário; células de perfusato placentário suplementadas com células PINK; células de perfusato placentário suplementadas tanto com perfusato placentário como com células PINK; células PINK suplementadas com perfusato placentário; células PINK suplementadas com células de perfusato placentário; ou células PINK suplementadas tanto com células de perfusato placentário como com perfusato placentário.

Adicionalmente são aqui proporcionados perfusato placentário, células de perfusato placentário e células assassinas naturais intermédias placentárias, e fracções reunidas dos mesmos ou combinações dos mesmos, que foram ensaiados para determinar o grau ou quantidade de supressão de tumor (isto é, a potência) que se pode esperar de, *e.g.*, um dado número de células de perfusato placentário ou PINK, ou e um dado volume de perfusato. Por exemplo, uma alíquota ou um número de células de amostra é posto em contacto com um número conhecido de células tumorais sob condições nas quais as células tumorais de outro modo proliferariam, e a velocidade de proliferação das células tumorais na presença de perfusato placentário, células de perfusato, células assassinas naturais placentárias ou suas combinações, ao longo do tempo (*e.g.*, 1,

2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 semanas, ou mais) é comparada com a proliferação de um número equivalente das células tumorais na ausência de perfusato, células de perfusato, células assassinas naturais placentárias, ou suas combinações. A potência do perfusato placentário, células de perfusato placentário e/ou células PINK, ou combinações ou frações reunidas dos mesmos, pode ser expressa, e.g., como o número de células ou volume de solução requerido para suprimir o crescimento de células de tumor, e.g., em cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, ou outras.

Em certas concretizações, perfusato placentário, células de perfusato placentário e células PINK são proporcionadas como unidades administráveis de grau farmacêutico. Estas unidades podem ser proporcionadas em volumes discretos, e.g., 100 mL, 150 mL, 200 mL, 250 mL, 300 mL, 350 mL, 400 mL, 450 mL, 500 mL, ou outros. Estas unidades podem ser proporcionadas de modo a conterem um número especificado de, e.g., células de perfusato placentário, células assassinas naturais intermédias placentárias, ou ambas, e.g., 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 ou mais células por mililitro, ou 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} ou mais células por unidade. Estas células podem ser proporcionadas para conterem números especificados de quaisquer dois, ou de todos os três, de perfusato placentário, células de perfusato placentário e/ou células PINK.

Nas combinações acima de perfusato placentário, células de perfusato placentário e/ou células PINK, qualquer um, quaisquer dois ou todos os três de perfusato placentário, células de perfusato placentário e/ou células PINK podem ser autólogos em relação a um recipiente (isto é, obtidos a partir do recipiente), ou homólogos em relação a um recipiente (isto é, obtidos a partir de pelo menos um outro indivíduo diferente do referido recipiente).

Qualquer das combinações ou frações reunidas de células PINK, células de perfusato placentário e/ou perfusato placentário pode compreender células assassinas naturais CD56⁺CD16⁺ a partir de, e.g., perfusato placentário, sangue

periférico, sangue do cordão umbilical, medula óssea, ou outros. Em concretizações específicas, as combinações compreendem cerca de, pelo menos cerca de, ou no máximo cerca de 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 ou mais destas células assassinas naturais por mililitro, ou 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} ou mais células por unidade. As células assassinas naturais CD56⁺CD16⁺ podem ser utilizadas conforme isoladas a partir de uma origem natural, ou podem ser expandidas antes da inclusão em uma das combinações ou fracções reunidas anteriores. As células NK CD56⁺CD16⁺ podem ser autólogas (isto é, obtidas a partir do mesmo indivíduo que o perfusato placentário, células de perfusato placentário e/ou células PINK; ou obtidas a partir de um recipiente) ou homólogas (isto é, obtidas a partir de um indivíduo diferente do perfusato placentário, células de perfusato placentário e/ou células PINK; ou a partir de um indivíduo que não é recipiente).

Preferivelmente, cada unidade é rotulada para especificar volume, número de células, tipo de células, se a unidade foi enriquecida para um tipo de célula particular, e/ou a potência de um dado número de células na unidade, ou um dado número de mililitros da unidade, que causa uma supressão mensurável da proliferação de um tipo ou tipos particulares de células tumorais.

São também aqui proporcionadas composições compreendendo células assassinas naturais intermédias placentárias, sozinhas ou em combinação com células de perfusato placentário e/ou perfusato placentário. Assim, noutro aspecto, é aqui proporcionada uma composição compreendendo células assassinas naturais CD56⁺, CD16⁻ isoladas, onde as referidas células assassinas naturais são isoladas a partir de perfusato placentário, e onde as referidas células assassinas naturais compreendem pelo menos 50% das células na composição. Numa concretização específica, as referidas células assassinas naturais compreendem pelo menos 80% das células na composição. Noutra concretização específica, a referida composição compreende células assassinas naturais CD56⁺, CD16⁺ isoladas. Numa concretização mais específica, as referidas células assassinas naturais CD56⁺, CD16⁺ são de um indivíduo diferente

das referidas células assassinas naturais CD56⁺, CD16⁻. Noutra concretização específica, as referidas células assassinas naturais são de um único indivíduo. Numa concretização mais específica, as referidas células assassinas naturais isoladas compreendem células assassinas naturais a partir de pelo menos dois indivíduos diferentes. Noutra concretização específica, a composição compreende perfusato placentário isolado. Numa concretização mais específica, o referido perfusato placentário é do mesmo indivíduo que as referidas células assassinas naturais. Noutra concretização mais específica, o referido perfusato placentário compreende perfusato placentário a partir de um indivíduo diferente das referidas células assassinas naturais. Noutra concretização específica, a composição compreende células de perfusato placentário. Numa concretização mais específica, as referidas células de perfusato placentário são do mesmo indivíduo que as referidas células assassinas naturais. Noutra concretização mais específica, as referidas células de perfusato placentário são de um indivíduo diferente das referidas células assassinas naturais. Noutra concretização específica, a composição compreende adicionalmente perfusato placentário isolado e células de perfusato placentário isolado, onde o referido perfusato isolado e as referidas células de perfusato placentário isolado são de diferentes indivíduos. Noutra concretização mais específica de qualquer das concretizações anteriores compreendendo perfusato placentário, o referido perfusato placentário compreende perfusato placentário de pelo menos dois indivíduos. Noutra concretização mais específica de qualquer das concretizações anteriores compreendendo células de perfusato placentário, as referidas células de perfusato placentário isoladas são de pelo menos dois indivíduos.

5.5.2. Composições compreendendo células estaminais placentárias aderentes

Noutras concretizações, o perfusato placentário, pluralidade de células de perfusato placentário e/ou pluralidade de células PINK, ou uma combinação ou fracção reunida de quaisquer dos anteriores, é suplementado com células estaminais placentárias aderentes. Estas células estaminais são descritas, e.g, em Hariri, Patentes dos E.U.A. N.^{os} 7 045

148 e 7 255 879. As células estaminais placentárias aderentes não são trofoblastos.

O perfusato placentário, pluralidade de células de perfusato placentário e/ou pluralidade de células PINK, ou uma combinação ou fracção reunida de quaisquer dos anteriores, pode ser suplementado com, *e.g.*, 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 ou mais células por mililitro, ou 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^1 , 5×10^1 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} ou mais células placentárias aderentes. As células estaminais placentárias aderentes nas combinações podem ser, *e.g.*, células estaminais placentárias aderentes que foram cultivadas durante, *e.g.*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 ou 40 duplicações de população, ou mais.

As células estaminais placentárias aderentes, quando cultivadas em culturas primárias ou em cultura de células, aderem ao substrato de cultura de tecido, *e.g.*, superfície do recipiente de cultura de tecido (*e.g.*, plástico de cultura de tecido). As células estaminais placentárias aderentes em cultura assumem um aspecto estrelado, geralmente fibroblastóide, com vários processos citoplásmicos prolongando-se desde o corpo celular central. Células estaminais placentárias aderentes são porém morfologicamente distinguíveis de fibroblastos cultivados sob as mesmas condições, uma vez que as células estaminais placentárias exibem um maior número destes processos do que os fibroblastos. Morfologicamente, as células estaminais placentárias são também distinguíveis das células estaminais hematopoiéticas, que assumem geralmente uma morfologia em cultura mais arredondada, ou paralelepipedica.

Células estaminais placentárias aderentes, e populações de células estaminais placentárias, úteis nas composições e métodos aqui proporcionadas, exprimem uma pluralidade de marcadores que podem ser utilizados para identificar e/ou isolar as células estaminais, ou populações de células que compreendem as células estaminais. As células estaminais placentárias aderentes e as populações de células estaminais aderentes úteis nas composições e métodos aqui proporcionados

incluem células estaminais e populações de células contendo células estaminais obtidas directamente a partir da placenta, ou de uma sua qualquer parte (e.g., âmnio, córion, placa amniocoriónica, cotilédones placentários, cordão umbilical, e outras). A população de células estaminais placentárias aderentes, numa concretização, é uma população (isto é, duas ou mais) de células estaminais placentárias aderentes em cultura, e.g., uma população num paciente, e.g., um saco.

As células estaminais placentárias aderentes exprimem geralmente os marcadores CD73, CD105, CD200, HLA-G e/ou OCT-4, e não exprimem CD34, CD38 ou CD45. As células estaminais placentárias aderentes podem também exprimir HLA-ABC (MHC-1) e HLA-DR. Estes marcadores podem ser utilizados para identificar células estaminais placentárias aderentes, e para distinguir células estaminais placentárias de outros tipos de células estaminais. Porque as células estaminais placentárias podem exprimir CD73 e CD105, estas podem ter características semelhantes a células estaminais mesenquimais. No entanto, porque as células estaminais placentárias aderentes podem exprimir CD200 e HLA-G, um marcador específico fetal, estas podem distinguir-se das células estaminais mesenquimais, e.g., células estaminais mesenquimais derivadas de medula óssea, que não exprimem nem CD200 nem HLA-G. Do mesmo modo, a ausência de expressão de CD34, CD38 e/ou CD45 identifica as células estaminais placentárias aderentes como células estaminais não hematopoiéticas.

Numa concretização, As células estaminais placentárias aderentes são CD200⁺, HLA-G⁺, onde as células estaminais suprimem detectavelmente a proliferação de células cancerosas ou o crescimento de tumor. Numa concretização específica, as referidas células estaminais aderentes são também CD73⁺ e CD105⁺. Noutra concretização específica, as referidas células estaminais aderentes são também CD34⁻, CD38⁻ ou CD45⁻. Numa concretização mais específica, as referidas células estaminais aderentes são também CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ e CD105⁺. Noutra concretização, as referidas células estaminais aderentes produzem um ou mais corpos tipo embrióide quando cultivadas sob condições que permitem a formação de corpos tipo embrióide.

Noutra concretização, as células estaminais placentárias aderentes são CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, onde as referidas células estaminais suprimem detectavelmente a proliferação de células cancerosas ou o crescimento de tumor. Numa concretização específica das referidas populações, as referidas células estaminais aderentes são HLA-G⁺. Noutra concretização específica, as referidas células estaminais aderentes são CD34⁻, CD38⁻ ou CD45⁻. Noutra concretização específica, as referidas células estaminais aderentes são CD34⁻, CD38⁻ e CD45⁻. Numa concretização mais específica, as referidas células estaminais aderentes são CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻ e HLA-G⁺. Noutra concretização específica, as referidas células estaminais placentárias aderentes produzem um ou mais corpos tipo embrióide quando cultivadas sob condições que permitem a formação de corpos tipo embrióide.

Noutra concretização, as células estaminais placentárias aderentes são CD200⁺, OCT-4⁺, onde as referidas células estaminais suprimem detectavelmente a proliferação de células cancerosas ou o crescimento de tumor. Numa concretização específica, as referidas células estaminais aderentes são CD73⁺ e CD105⁺. Noutra concretização específica, as referidas células estaminais aderentes são HLA-G⁺. Noutra concretização específica, as referidas células estaminais aderentes são CD34⁻, CD38⁻ e CD45⁻. Numa concretização mais específica, as referidas células estaminais aderentes são CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ e HLA-G⁺. Noutra concretização específica, as células estaminais placentárias aderentes produzem um ou mais corpos tipo embrióide quando cultivadas sob condições que permitem a formação de corpos tipo embrióide.

Noutra concretização, as células estaminais placentárias aderentes são CD73⁺, CD105⁺ e HLA-G⁺, onde as referidas células estaminais aderentes suprimem detectavelmente a proliferação de células cancerosas ou o crescimento de tumor. Numa concretização específica da pluralidade acima, as referidas células estaminais aderentes são também CD34⁻, CD38⁻ ou CD45⁻. Noutra concretização específica, as referidas células estaminais aderentes são também CD34⁻, CD38⁻ e CD45⁻. Noutra concretização específica, as referidas células estaminais aderentes são também OCT-4⁺. Noutra concretização específica, as referidas células estaminais aderentes são também CD200⁺.

Numa concretização mais específica, as referidas células estaminais aderentes são também CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ e CD200⁺.

Noutra concretização, as células estaminais placentárias aderentes são células estaminais CD73⁺, CD105⁺, onde as referidas células estaminais produzem um ou mais corpos tipo embrióide sob condições que permitem a formação de corpos tipo embrióide, e onde as referidas células estaminais aderentes suprimem detectavelmente a proliferação de células cancerosas ou o crescimento de tumor. Numa concretização específica, as referidas células estaminais aderentes são também CD34⁻, CD38⁻ ou CD45⁻. Noutra concretização específica, as referidas células estaminais aderentes são também CD34⁻, CD38⁻ e CD45⁻. Noutra concretização específica, as referidas células estaminais aderentes são também OCT-4⁺. Numa concretização mais específica, as referidas células estaminais aderentes são também OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻ e CD45⁻.

Noutra concretização, as células estaminais placentárias aderentes são células estaminais OCT-4⁺, onde as referidas células estaminais placentárias aderentes produzem um ou mais corpos tipo embrióide quando cultivadas sob condições que permitem a formação de corpos tipo embrióide, e onde as referidas células estaminais foram identificadas como suprimindo detectavelmente a proliferação de células cancerosas ou o crescimento de tumor.

Em várias concretizações, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50% pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% das referidas células placentárias isoladas são células estaminais OCT4⁺. Numa concretização específica das populações acima, as referidas células estaminais são CD73⁺ e CD105⁺. Noutra concretização específica, as referidas células estaminais são CD34⁻, CD38⁻ ou CD45⁻. Noutra concretização específica, as referidas células estaminais são CD200⁺. Numa concretização mais específica, as referidas células estaminais são CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻ e CD45⁻. Noutra concretização específica, a referida população foi expandida, por exemplo, submetida a passagem pelo menos uma vez, pelo

menos três vezes, pelo menos cinco vezes, pelo menos 10 vezes, pelo menos 15 vezes ou pelo menos 20 vezes.

Numa concretização mais específica de qualquer das concretizações anteriores, as células placentárias aderentes exprimem ABC-p (uma proteína de transportador ABC específica de placenta; ver, e.g., Allikmets *et al.*, Cancer Res. 58(23):5337-9 (1998)).

Noutra concretização, as células estaminais placentárias aderentes são CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻ e CD133⁻. Noutra concretização, as células estaminais placentárias aderentes, as células estaminais placentárias segregam constitutivamente IL-6, IL-8 e proteína quimioattractora de monócitos (MCP-1).

Cada uma das células estaminais placentárias referenciadas acima pode compreender células estaminais placentárias obtidas e isoladas directamente a partir de uma placenta de mamífero, ou células estaminais placentárias que foram cultivadas e submetidas a passagem pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30 ou mais vezes, ou uma sua combinação. Pluralidades supressoras de células de tumor das células estaminais placentárias aderentes descritas acima podem compreender cerca de, pelo menos, ou não mais do que, 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} ou mais células estaminais placentárias aderentes.

5.5.3. Composições compreendendo meios condicionados de células estaminais placentárias

É também aqui proporcionada a utilização de uma composição supressora de tumor compreendendo células PINK, perfusato placentário e/ou perfusato placentário, e adicionalmente meio condicionado. Células estaminais placentárias aderentes, células de perfusato placentário e/ou células assassinas naturais intermédias placentárias podem ser utilizadas para produzir meio condicionado que é supressor de células de tumor, isto é, meio compreendendo uma ou mais biomoléculas segregadas ou excretadas pelas células estaminais que têm um efeito supressor de células de tumor detectável sobre uma pluralidade

de um ou mais tipos de células imunitárias. Em várias concretizações, o meio condicionado compreende meio no qual células placentárias (e.g., células estaminais, células de perfusato placentário, células PINK) foram cultivadas durante pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou mais dias. Noutras concretizações, o meio condicionado compreende meio no qual células placentárias foram cultivadas até pelo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% de confluência, ou até 100% de confluência. Este meio condicionado pode ser utilizado para suportar a cultura de uma população distinta de células placentárias, ou células de outro tipo. Noutra concretização, o meio condicionado aqui proporcionado compreende meio no qual foram cultivadas células estaminais placentárias aderentes e células estaminais não placentárias.

Este meio condicionado pode ser combinado com qualquer de, ou qualquer combinação de, perfusato placentário, células de perfusato placentário, e/ou células assassinas naturais intermédias placentárias para formar uma composição supressora de células tumorais. Em certas concretizações, a composição compreende menos de metade de meio condicionado em volume, e.g., cerca de, ou menos do que cerca de, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% ou 1% em volume.

Assim, numa concretização, é aqui proporcionada uma composição compreendendo meio de cultura a partir de uma cultura de células estaminais placentárias, onde as referidas células estaminais placentárias (a) aderem a um substrato; (b) exprimem CD200 e HLA-G, ou exprimem CD73, CD105 e CD200, ou exprimem CD200 e OCT-4, ou exprimem CD73, CD105 e HLA-G, ou exprimem CD73 e CD105 e facilitam a formação de um ou mais corpos tipo embrióide numa população de células placentárias que compreendem as células estaminais placentárias, quando a referida população é cultivada sob condições que permitem a formação de corpos tipo embrióide, ou exprimem OCT-4 e facilitam a formação de um ou mais corpos tipo embrióide numa população de células placentárias que compreendem as células estaminais placentárias quando a referida população é cultivada sob condições que permitem a formação de corpos tipo embrióide; e (c) suprimem detectavelmente o crescimento ou proliferação de uma célula tumoral ou população de células tumorais. Numa concretização específica, a composição

compreende adicionalmente uma pluralidade das referidas células estaminais placentárias. Noutra concretização específica, a composição compreende uma pluralidade de células não placentárias. Numa concretização mais específica, as referidas células não placentárias compreendem células CD34⁺, e.g., células progenitoras hematopoiéticas, tais como células progenitoras hematopoiéticas de sangue periférico, células progenitoras hematopoiéticas de sangue de cordão ou células progenitoras hematopoiéticas de sangue placentário. As células não placentárias podem também compreender outras células estaminais, tais como células estaminais mesenquimais, e.g., células estaminais mesenquimais derivadas de medula óssea. As células não placentárias podem também ser de um ou mais tipos de linhas de células ou células adultas. Noutra concretização específica, a composição compreende um agente antiproliferativo, e.g., um anticorpo anti-MIP-1 ou anti-MIP-1.

Numa concretização específica, obtém-se meio de cultura condicionado ou sobrenadante de células placentários a partir de uma pluralidade de células estaminais placentárias co-cultivadas com uma pluralidade de células tumorais numa proporção de cerca de 1:1, cerca de 2:1, cerca de 3:1, cerca de 4:1 ou cerca de 5:1 células estaminais placentárias para células tumorais. Por exemplo, o meio de cultura condicionado ou sobrenadante pode ser obtido a partir de uma cultura compreendendo cerca de 1×10^5 células estaminais placentárias, cerca de 1×10^6 células estaminais placentárias, cerca de 1×10^7 células estaminais placentárias, cerca de 1×10^8 células estaminais placentárias, ou mais. Noutra concretização específica, o meio de cultura condicionado ou sobrenadante é obtido a partir de uma co-cultura compreendendo cerca de 1×10^5 a cerca de 5×10^5 células estaminais placentárias e cerca de 1×10^5 células tumorais; cerca de 1×10^6 a cerca de 5×10^6 células estaminais placentárias e cerca de 1×10^6 células tumorais; cerca de 1×10^7 a cerca de 5×10^7 células estaminais placentárias e cerca de 1×10^7 células tumorais; ou cerca de 1×10^8 a cerca de 5×10^8 células estaminais placentárias e cerca de 1×10^8 células tumorais.

Numa concretização específica, o meio condicionado adequado para administração a um indivíduo de 70 kg compreende

sobrenadante condicionado por cerca de 70 milhões de células estaminais placentárias em cerca de 200 mL de meio de cultura.

O meio condicionado pode ser condensado para preparar um produto de grau farmacêutico administrável. Por exemplo, meio condicionado pode ser condensado até cerca de 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% ou mais por remoção de água, *e.g.*, por evaporação, liofilização, ou outros. Numa concretização específica, por exemplo, 200 mL de meio condicionado a partir de cerca de 70 milhões de células estaminais placentárias podem ser condensados até um volume de cerca de 180 mL, 160 mL, 140 mL, 120 mL, 100 mL, 80 mL, 60 mL, 40 mL, 20 mL ou menos. O meio condicionado pode também ser substancialmente seco, *e.g.*, até um pó, *e.g.*, por evaporação, liofilização ou outros.

5.6. Preservação de perfusato e células placentárias

Perfusato placentário ou células placentárias, *e.g.*, células de perfusato, células assassinas naturais combinadas e células PINK, podem ser preservados, isto é, colocados sob condições que permitem o armazenamento de longo prazo, ou sob condições que inibem a morte celular, *e.g.*, por apoptose ou necrose.

Pode-se produzir perfusato placentário por passagem de uma composição de células placentárias através de pelo menos uma parte da placenta, *e.g.*, através da vasculatura placentária. A composição de colheita de células placentárias compreende um ou mais compostos que actuam para preservar as células contidas no perfusato. Uma tal composição de colheita de células placentárias é descrita na Secção 5.1, acima, *e.g.*, uma composição compreendendo um inibidor de apoptose, um inibidor de necrose e/ou perfluorocarboneto portador de oxigénio, conforme descrito no Pedido de Patente dos E.U.A. relacionado N.º 11/648812, intitulado "Improved Composition for Collecting and Preserving Placental Stem Cells e Methods of Using the Composition" depositado em 28 de Dezembro de 2006, Numa concretização, a composição de colheita de células placentárias, que se fez passar através da placenta ou tecido placentário, é o perfusato placentário útil nos métodos descritos na Secção 5.4, abaixo.

Numa concretização, perfusato placentário e/ou células placentárias são colhidos a partir de um mamífero, e.g., placenta pós-parto de humano, por contacto das células com uma composição de colheita de células placentárias compreendendo um inibidor de apoptose e um perfluorocarboneto portador de oxigénio, onde o referido inibidor de apoptose está presente numa quantidade e durante um tempo suficientes para reduzir ou prevenir a apoptose na população de células estaminais, em comparação com uma população de células estaminais não postas em contacto com o inibidor de apoptose. Por exemplo, a placenta pode ser perfundida com a composição de colheita de células placentárias, e células placentárias, e.g., células placentárias nucleadas totais, são isoladas a partir daí. Numa concretização específica, o inibidor de apoptose é um inibidor de caspase. Noutra concretização específica, o referido inibidor de apoptose é um inibidor de JNK. Numa concretização mais específica, o referido inibidor de JNK não modula a diferenciação ou proliferação das referidas células estaminais. Noutra concretização, a composição de colheita de células placentárias compreende o referido inibidor de apoptose e o referido perfluorocarboneto portador de oxigénio em fases distintas. Noutra concretização, a composição de colheita de células placentárias compreende o referido inibidor de apoptose e o referido perfluorocarboneto portador de oxigénio numa emulsão. Noutra concretização, a composição de colheita de células placentárias compreende adicionalmente um emulsionante, e.g., lecitina. Noutra concretização, o referido inibidor de apoptose e o referido perfluorocarboneto estão entre cerca de 0°C e cerca de 25°C no momento do contacto com as células placentárias. Noutra concretização mais específica, o referido inibidor de apoptose e o referido perfluorocarboneto estão entre cerca de 2°C e 10°C, ou entre cerca de 2°C e cerca de 5°C, no momento do contacto com as células placentárias. Noutra concretização mais específica, o referido contacto é realizado durante o transporte da referida população de células estaminais. Noutra concretização mais específica, o referido contacto é realizado durante a congelação e descongelação da referida população de células estaminais.

Noutra concretização, perfusato placentário e/ou células placentárias podem ser colhidos e preservados por contacto do

perfusato e/ou células com um inibidor de apoptose e um composto de preservação de órgãos, onde o referido inibidor de apoptose está presente numa quantidade e durante um tempo suficientes para reduzir ou prevenir a apoptose das células, em comparação com perfusato ou células placentárias não postos em contacto com o inibidor de apoptose.

Numa concretização específica, o composto de preservação de órgão é solução UW (descrita na Patente dos E.U.A. N.º 4 798 824; também conhecida como VIASPAN™; ver também Southard *et al.*, *Transplantation* 49(2):251-257 (1990) ou uma solução descrita em Stem *et al.*, Patente dos E.U.A. N.º 5 552 267. Noutra concretização, a referida composição de preservação de órgãos é hidroxietilamido, ácido lactobiónico, rafinose ou uma sua combinação. Noutra concretização, a composição de colheita de células placentárias compreende adicionalmente um perfluorocarboneto portador de oxigénio, quer em duas fases quer como uma emulsão.

Noutra concretização do método, perfusato placentário e/ou células placentárias são postos em contacto com uma composição de colheita de células placentárias compreendendo um inibidor de apoptose e perfluorocarboneto portador de oxigénio, composto de preservação de órgãos, ou sua combinação, durante a perfusão. Noutra concretização, células placentárias são postas em contacto com o referido composto de colheita de células estaminais após colheita por perfusão.

Tipicamente, durante a colheita, enriquecimento e isolamento de células placentárias, é preferível minimizar ou eliminar a tensão para as células devido a hipoxia e tensão mecânica. Noutra concretização do método, por conseguinte, perfusato placentário, uma célula placentária ou população de células placentárias são exposto a uma condição hipóxica durante a colheita, enriquecimento e isolamento por menos de seis horas durante a referida preservação, onde uma condição hipóxica é uma concentração de oxigénio que é menos do que a concentração normal de oxigénio no sangue. Numa concretização mais específica, a referida população de células placentárias é exposta à referida condição hipóxica por menos de duas horas durante a referida preservação. Noutra concretização mais específica, a referida população de células placentárias é

exposta à referida condição hipóxica por menos de uma hora, ou menos de trinta minutos, ou não é exposta a uma condição hipóxica, durante a colheita, enriquecimento ou isolamento. Noutra concretização específica, a referida população de células placentárias não é exposta a tensão de cisalhamento durante a colheita, enriquecimento ou isolamento.

As células placentárias aqui proporcionadas podem ser criopreservadas, e.g., em meio de criopreservação em pequenos recipientes, e.g., ampolas. Meio de criopreservação adequado inclui, mas não está limitado a, meio de cultura incluindo, e.g., meio de crescimento, ou meio de congelação de células, por exemplo meio de congelação de células disponível comercialmente, e.g., C2695, C2639 ou C6039 (Sigma). O meio de criopreservação compreende preferivelmente DMSO (dimetilsulfóxido) numa concentração de, e.g., cerca de 10% (v/v). O meio de criopreservação pode compreender agentes adicionais, por exemplo, metilcelulose e/ou glicerol. Durante a criopreservação as células placentárias são preferivelmente arrefecidas a 1°C/min. Uma temperatura de criopreservação preferida é cerca de -80°C a cerca de -180°C, preferivelmente cerca de -125°C a cerca de -140°C. As células placentárias criopreservadas podem ser transferidas para azoto líquido antes da descongelação para uso. Em algumas concretizações, por exemplo, assim que as ampolas atingem cerca de -90°C, estas são transferidas para uma área de armazenamento de azoto líquido. Preferivelmente as células criopreservadas são descongeladas a uma temperatura de cerca de 25°C a cerca de 40°C, preferivelmente a uma temperatura de cerca de 37°C.

5.7. Utilização de perfusato placentário, células PINK e células assassinas naturais placentárias combinadas para suprimir o crescimento de células tumorais

São também aqui proporcionados métodos de supressão do crescimento, e.g., proliferação, de células tumorais utilizando perfusato placentário, células isoladas a partir de perfusato placentário, células assassinas naturais combinadas isoladas, ou células assassinas naturais placentárias isoladas, e.g., células assassinas naturais intermédias derivadas de placenta.

Numa concretização, é aqui proporcionado um método de supressão da proliferação de uma célula tumoral, ou pluralidade de células tumorais, compreendendo pôr em contacto a célula tumoral ou pluralidade de células tumorais com perfusato placentário, células de perfusato placentário, células assassinas naturais combinadas isoladas e/ou células PINK, tal que a proliferação da célula tumoral ou pluralidade de células tumorais é detectavelmente reduzida em comparação com uma célula tumoral ou pluralidade de células tumorais do mesmo tipo não postas em contacto com o perfusato placentário, células de perfusato, células assassinas naturais combinadas isoladas e/ou células PINK.

Como aqui utilizado, "pôr em contacto" numa concretização, abrange contacto físico directo, e.g., célula-célula, entre perfusato placentário, células de perfusato placentário, células assassinas naturais placentárias, e.g., células assassinas naturais intermédias placentárias, e/ou células assassinas naturais combinadas isoladas; e uma célula tumoral ou pluralidade de células tumorais. Noutra concretização, "pôr em contacto" abrange a presença no mesmo espaço físico, e.g., perfusato placentário, células de perfusato placentário, células assassinas naturais placentárias, e.g., células assassinas naturais intermédias placentárias, e/ou células assassinas naturais combinadas isoladas são colocados no mesmo recipiente (e.g., placa de cultura, placa de múltiplos poços) que uma célula tumoral ou pluralidade de células tumorais. Noutra concretização, "pôr em contacto" perfusato placentário, células de perfusato placentário, células assassinas naturais combinadas ou células assassinas naturais intermédias placentárias, e uma célula tumoral ou pluralidade de células tumorais é efectuado, e.g., por injecção ou perfusão do perfusato placentário ou células, e.g., células de perfusato placentário, células assassinas naturais combinadas ou células assassinas naturais intermédias placentárias, num indivíduo, e.g., um humano compreendendo uma célula tumoral ou pluralidade de células tumorais, e.g., um paciente de cancro.

Em certas concretizações, o perfusato placentário é utilizado em qualquer quantidade que resulte num benefício terapêutico detectável para um indivíduo compreendendo uma

célula tumoral ou pluralidade de células tumorais, *e.g.*, um paciente de cancro. Em certas outras concretizações, células de perfusato placentário, células assassinas naturais intermédias placentárias, e/ou células assassinas naturais combinadas são utilizadas em qualquer quantidade que resulte num benefício terapêutico detectável para um indivíduo compreendendo uma célula tumoral ou pluralidade de células tumorais. Assim, noutra concretização, é aqui proporcionado um método de supressão da proliferação de uma célula tumoral, ou pluralidade de células tumorais, compreendendo pôr em contacto a célula tumoral ou pluralidade de células tumorais com perfusato placentário, células de perfusato placentário e/ou uma célula assassina natural intermédia derivada de placenta, ou pluralidade de células PINK, num indivíduo tal que o referido contacto é detectavelmente ou demonstravelmente terapêuticamente benéfico para o referido indivíduo.

Como aqui utilizado, "benefícios terapêuticos" incluem, mas não estão limitados a, *e.g.*, redução no tamanho de um tumor; diminuição ou cessação da expansão de um tumor; redução no número de células cancerosas numa amostra de tecido, *e.g.*, uma amostra de sangue, por unidade de volume; a melhoria clínica de qualquer sintoma do cancro particular que o referido indivíduo tem, a diminuição ou cessação do agravamento de qualquer sintoma do cancro particular que o indivíduo tem, *etc.* O contacto de perfusato placentário, células de perfusato placentário e/ou células PINK que consegue qualquer um ou mais destes benefícios terapêuticos é referido como sendo terapêuticamente benéfico.

Em certas concretizações, células de perfusato placentário, *e.g.*, células nucleadas a partir de perfusato placentário, células assassinas naturais combinadas e/ou células assassinas naturais intermédias placentárias são utilizadas em qualquer quantidade ou número que resulte num benefício terapêutico detectável para um indivíduo compreendendo uma célula tumoral ou pluralidade de células tumorais, *e.g.*, um paciente de cancro. Células de perfusato placentário, células assassinas naturais combinadas e/ou células assassinas naturais placentárias, *e.g.*, células assassinas naturais intermédias placentárias, podem ser administradas a um tal indivíduo por números de células, *e.g.*,

podem ser administradas ao referido indivíduo cerca de, pelo menos cerca de, ou no máximo cerca de, 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} ou 5×10^{10} células de perfusato placentário, células assassinas naturais combinadas e/ou células assassinas naturais. Noutras concretizações, células de perfusato placentário, células assassinas naturais combinadas e/ou células assassinas naturais intermédias derivadas de placenta podem ser administradas a um tal indivíduo por números de células, e.g., podem ser administradas ao referido indivíduo cerca de, pelo menos cerca de, ou no máximo cerca de, 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} ou 5×10^{10} células de perfusato placentário, células assassinas naturais combinadas e/ou células assassinas naturais por quilograma do indivíduo. Células de perfusato placentário e/ou células assassinas naturais intermédias derivadas de placenta podem ser administradas a um tal indivíduo de acordo com uma proporção aproximada entre células de perfusato placentário e/ou células assassinas naturais placentárias, e.g., células assassinas naturais intermédias placentárias, e células tumorais no referido indivíduo. Por exemplo, células de perfusato placentário e/ou células assassinas naturais placentárias, e.g., células assassinas naturais intermédias placentárias, podem ser administradas ao referido indivíduo numa proporção de cerca de, pelo menos cerca de, ou no máximo cerca de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, 95:1 ou 100:1 em relação ao número de células tumorais no indivíduo. O número de células tumorais num tal indivíduo pode ser estimado, e.g., por contagem do número de células tumorais numa amostra de tecido a partir do indivíduo, e.g., amostra de sangue, biopsia ou outra. Em concretizações específicas, e.g., para tumores sólidos, a referida contagem é realizada em combinação com imagiologia do tumor ou tumores para obter um volume de tumor aproximado.

Adicionalmente é aqui proporcionado um método para a supressão da proliferação de uma célula tumoral ou pluralidade de células tumorais utilizando combinações de perfusato placentário, células de perfusato placentário, células assassinas naturais combinadas e/ou células assassinas

naturais intermédias derivadas de placenta. Em várias concretizações, é aqui proporcionado um método de supressão da proliferação de uma célula tumoral ou pluralidade de células tumorais compreendendo pôr em contacto a referida célula tumoral ou células tumorais com perfusato placentário suplementado com uma pluralidade de células de perfusato placentário ou células PINK; células de perfusato placentário suplementadas com perfusato placentário ou uma pluralidade de células PINK; células PINK suplementadas com perfusato placentário e células de perfusato placentário; uma pluralidade de células PINK e uma pluralidade de células assassinas naturais combinadas; uma pluralidade de células assassinas naturais combinadas e uma pluralidade de células de perfusato placentário; perfusato placentário suplementado com células assassinas naturais combinadas; ou uma combinação da totalidade de perfusato placentário, células de perfusato placentário, células assassinas naturais combinadas e células PINK.

Numa concretização específica, por exemplo, a proliferação de uma célula tumoral ou pluralidade de células tumorais é suprimida por perfusato placentário suplementado com uma pluralidade de células de perfusato placentário, células assassinas naturais combinadas e/ou uma pluralidade de células assassinas naturais intermédias placentárias. Em concretizações específicas, por exemplo, cada mililitro de perfusato placentário está suplementado com cerca de 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 ou mais células de perfusato placentário ou células assassinas naturais intermédias placentárias. Noutras concretizações específicas, perfusato placentário, *e.g.*, uma unidade (*i.e.*, a colheita a partir de uma única placenta), ou cerca de 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 ou 1000 mL de perfusato, está suplementada com cerca de 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 ou mais células PINK, células assassinas naturais combinadas e/ou células de perfusato placentário por mililitro, ou 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} ou mais células PINK, células assassinas naturais combinadas e/ou células de perfusato placentário.

Noutra concretização específica, a proliferação de uma célula tumoral ou pluralidade de células tumorais é suprimida por uma pluralidade de células de perfusato placentário suplementadas com perfusato placentário, células assassinas naturais combinadas e/ou células assassinas naturais intermédias placentárias. Em concretizações mais específicas, cerca de 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 ou mais células de perfusato placentário por mililitro, ou 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} ou mais células de perfusato placentário, são suplementadas com cerca de, ou pelo menos cerca de, 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 ou mais células PINK e/ou células assassinas naturais combinadas por mililitro, ou 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} ou mais células PINK. Noutras concretizações mais específicas, cerca de 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 ou mais células de perfusato placentário, células PINK e/ou células assassinas naturais combinadas por mililitro, ou 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} ou mais células de perfusato placentário, são suplementadas com cerca de, ou pelo menos cerca de, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 ou 1000 mL de perfusato, ou cerca de 1 unidade de perfusato.

Noutra concretização específica, a proliferação de uma célula tumoral ou pluralidade de células tumorais é suprimida por uma pluralidade de células assassinas naturais intermédias placentárias suplementadas por perfusato placentário, células de perfusato placentário e/ou células assassinas naturais combinadas. Em concretizações mais específicas, cerca de 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 ou mais células assassinas naturais intermédias placentárias, ou 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , $1 \times$

10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} ou mais células PINK, são suplementadas com cerca de 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 ou mais células de perfusato placentário e/ou células assassinas naturais combinadas por mililitro, ou 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} ou mais células de perfusato placentário e/ou células assassinas naturais combinadas. Noutras concretizações mais específicas, cerca de 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 ou mais células de perfusato placentário e/ou células assassinas naturais combinadas por mililitro, ou 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} ou mais células assassinas naturais intermédias placentárias e/ou células assassinas naturais combinadas são suplementadas com cerca de, ou pelo menos cerca de, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 ou 1000 mL de perfusato, ou cerca de 1 unidade de perfusato.

Noutra concretização, a proliferação de uma célula tumoral ou pluralidade de células tumorais é suprimida pondo em contacto a célula tumoral ou células tumorais com perfusato placentário, células de perfusato, células PINK e/ou células assassinas naturais combinadas suplementadas com células estaminais placentárias aderentes. Em concretizações específicas, o perfusato placentário, células de perfusato ou células PINK são suplementados com cerca de 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 ou mais células estaminais placentárias aderentes por mililitro, ou 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} ou mais células estaminais placentárias aderentes.

Noutra concretização, a proliferação de uma célula tumoral ou pluralidade de células tumorais é suprimida pondo em contacto a célula tumoral ou células tumorais com perfusato placentário, células de perfusato, células assassinas naturais

combinadas e/ou células PINK suplementadas com meio condicionado por células estaminais placentárias aderentes, e.g., 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,1, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mL de meio de cultura condicionado por células estaminais por unidade de perfusato, células de perfusato, células assassinas naturais combinadas e/ou células PINK, ou por 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 ou 10^{10} células.

Noutras concretizações, o perfusato placentário, células de perfusato placentário, células assassinas naturais placentárias, e.g., células PINK, células assassinas naturais combinadas, e combinações e fracções reunidas compreendendo os mesmos, são utilizados como inicialmente obtidos, isto é, perfusato conforme obtido durante a perfusão, células de perfusato placentário conforme isoladas a partir de tal perfusato, células assassinas naturais combinadas a partir de tal perfusato e sangue do cordão umbilical correspondente, ou células PINK isoladas a partir de tal perfusato ou de tais células de perfusato placentário. Noutras concretizações, o perfusato placentário, células de perfusato placentário, células PINK, e combinações e fracções reunidas dos mesmos são processados antes do uso. Por exemplo, perfusato placentário pode ser utilizado na sua forma em bruto, não processada, conforme recolhido a partir da placenta. O perfusato placentário pode também ser processado antes do uso, e.g., pela selecção negativa de um ou mais tipos de células, redução em volume por desidratação; liofilização e reidratação, etc. Similarmente, populações de células de perfusato podem ser utilizadas conforme inicialmente isoladas a partir de perfusato placentário, e.g., como células nucleadas totais a partir de perfusato placentário, ou podem ser processadas, e.g., para remover um ou mais tipos de células (e.g., eritrócitos). As células PINK podem ser utilizadas conforme inicialmente isoladas a partir de perfusato placentário, e.g., utilizando micropérolas de CD56, ou podem ser processadas, e.g., para remover um ou mais tipos de células não assassinas.

Noutra concretização, é aqui proporcionado um método de supressão da proliferação de uma célula tumoral ou células tumorais, compreendendo pôr em contacto a célula tumoral ou células tumorais com perfusato placentário, células de perfusato placentário, células PINK, células assassinas

naturais combinadas, ou fracções reunidas ou combinações compreendendo os mesmos, onde o referido perfusato placentário, células de perfusato placentário, células PINK, células assassinas naturais combinadas, ou fracções reunidas ou combinações compreendendo os mesmos, foram postos em contacto com interleucina-2 (IL-2) por um período de tempo antes do referido contacto. Em certas concretizações, o referido período de tempo é cerca de, pelo menos, ou no máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 ou 48 antes do referido contacto.

O perfusato, células de perfusato, células PINK, células assassinas naturais combinadas e/ou combinações dos mesmos podem ser administrados uma vez a um indivíduo com cancro, ou um indivíduo com células tumorais durante um curso de terapia anticancro, ou podem ser administrados múltiplas vezes, e.g., uma vez a cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ou 23 horas, ou uma vez a cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dias, ou uma vez a cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais semanas durante a terapia. O perfusato, células de perfusato, células PINK, fracções reunidas e/ou combinações dos mesmos podem ser administrados sem ter em consideração se o perfusato, células de perfusato, células PINK, fracções reunidas e/ou combinações dos mesmos foram administrados a uma pessoa com cancro, ou com células tumorais, no passado. Assim, os métodos aqui proporcionadas abrangem a administração a uma pessoa com cancro ou com células tumorais de qualquer combinação de perfusato placentário, células de perfusato, células PINK, fracções reunidas e/ou combinações compreendendo os mesmos.

Numa concretização específica, as células tumorais são células de cancro sanguíneo. Em várias concretizações específicas, as células tumorais são células de carcinoma ductal primário, células de leucemia, células de leucemia de célula T aguda, células de linfoma mielóide crónico (CML), células de leucemia mielógena aguda, células de leucemia mielógena crónica (CML), células de carcinoma do pulmão, células de adenocarcinoma do cólon, células de linfoma histiocítico, células de mieloma múltiplo, células de

retinoblastoma, células de carcinoma colo-rectal ou células de adenocarcinoma colo-rectal.

O perfusato placentário, células de perfusato, células PINK, células assassinas naturais combinadas, fracções reunidas e/ou combinações compreendendo os mesmos podem ser parte de um regime de terapia anticancro que inclui um ou mais outros agentes anticancro. Estes agentes anticancro são bem conhecidos na especialidade. Agentes anticancro específicos que podem ser administrados a um indivíduo com cancro, para além do perfusato, células de perfusato, células PINK, fracções reunidas e/ou combinações dos mesmos, incluem, mas não estão limitados a: acivicina; aclarrubicina; cloridrato de acodazole; acronina; adozelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; amsacrina; anastrozole; antramicina; asparaginase; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; cloridrato de bisantreno; dimesilato de bisnafide; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; bussulfano; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatina; carmustina; cloridrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; celecoxib (inibidor de COX-2); clorambucil; cirolemicina; cisplatina; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; cloridrato de daunorrubicina; decitabina; dexormaplatina; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziquona; docetaxel; doxorrubicina; cloridrato de doxorrubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; cloridrato de eflomitina; elsamitrucina; enloplatina; enpromato; epipropidina; cloridrato de epirubicina; erbulozole; cloridrato de esorrubicina; estramustina; fosfato sódico de estramustina; etanidazole; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; cloridrato de fadrozole; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gencitabina; cloridrato de gencitabina; hidroxiureia; cloridrato de idarrubicina; ifosfamida; ilmofosina; iproplatina; irinotecano; cloridrato de irinotecano; acetato de lanreotide; letrozole; acetato de leuprolida; cloridrato de liarozole; lometrexol sódico; lomustina; cloridrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; cloridrato de mecloretamina; acetato

de megestrol; acetato de melengestrol; melfalano; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedapa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; cloridrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazole; nogalamicina; ormaplatina; oxisurano; paclitaxel; pegaspargase; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromano; pipossulfano; cloridrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfimer sódico; porfiromicina; prednimustina; cloridrato de procarbazona; puromicina; cloridrato de puromicina; pirazofurina; riboprina; safingol; cloridrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sódico; esparsomicina; cloridrato de espirogermânio; espiromustina; espiroplatina; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan sódico; taxotere; tegafur; cloridrato de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; cloridrato de tubulozole; mostarda de uracilo; uredepa; vaporeotide; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartarato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozole; zeniplatina; zinostatina; e cloridrato de zorubicina.

Outros fármacos anticâncer incluem, mas não estão limitadas a: 20-epi-1,25-di-hidroxitociferol D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarubicina; acilfulveno; adacipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozole; andrografolide; inibidores de angiogênese; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína morfogenética-1 anti-dorsalizante; antiandrogênio, carcinoma prostático; antiestrogênio; antineoplaston; oligonucleótidos anti-sentido; glicinato de afidicolina; moduladores do gene da apoptose; reguladores da apoptose; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina-desaminase; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3;

azasetron; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosporina; derivados de beta-lactama; beta-aletina; betaclamina B; ácido betulínico; inibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; butionina-sulfoximina; calcipotriol; calfostina C; derivados de camptotecina; capecitabina; carboxamida-amino-triazole; carboxiamidotriazole; CaRest M3; CARN 700; inibidor derivado de cartilagem; carzelesina; inibidores de caseína-quinase (ICOS); castanoespermina; cecropina B; cetorelix; clorinas; cloroquinoxalina-sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazole; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; citarabina ocfosfato; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; desidrodidenmina B; deslorelina; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamil; diaziquona; didemnina B; didox; dietilnorespermina; di-hidro-5-azacitidina; di-hidrotaxol, 9-; dioxamicina; difenilespiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetron; doxifluridina; doxorubicina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemene; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrogénio; antagonistas de estrogénio; etanidazole; etopósido fosfato; exemestano; fadrozole; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; cloridrato de fluorodaunorrunicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; gadolínio texafirina; nitrato de gálio; galocitabina; ganirelix; inibidores de gelatinase; gencitabina; inibidores de glutatona; hepsulfam; heregulina; hexametileno bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imatinib (e.g., GLEEVEC®), imiquimod; péptidos imunostimulantes; inibidor de receptor de factor de crescimento 1 do tipo insulina; agonistas de interferão; interferões; interleucinas; iobenguane; iododoxorubicina; ipomeanol, 4-; iroplact; irsogladina; isobengazole; iso-homohalicondrina B; itasetron; jasplaquinolida; kahalalide F;

lamelarina-N triacetato; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinano; leptolestatina; letrozole; factor de inibição da leucemia; alfa-interferão de leucócito; leuprolida + estrogénio + progesterona; leuprorelina; levamisole; liarozole; análogo de poliamina linear; péptido dissacárido lipofílico; comostos de platina lipofílicos; lissoclinamida 7; lobaplatina; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; loxoribina; lurtotecan; lutécio texafirina; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspina; inibidores de matrilisina; inibidores de metaloproteinase de matriz; menogaril; merbarona; meterelina; metioninase; metoclopramida; inibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafide; mitotoxina factor de crescimento de fibroblasto-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; Erbitux, gonadotrofina coriónica humana; monofosforil-lípido A + sk de parede celular de micobactéria; mopidamol; agente anticancro de mostarda; micaperóxido B; extracto de parede celular micobacteriana; miriaporona; N-acetildinalina; benzamidas N-substituídas; nafarelina; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatina; nemorrubicina; ácido neridrónico; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; nítróido antioxidante; nitrulina; oblimersen (GENASENSE®); O⁶-benzilguanina; octreotida; oquicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetron; ondansetron; oracina; indutor de citoquina oral; ormaplatina; osaterona; oxaliplatina; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargase; peldesina; pentosano polissulfato sódico; pentostatina; pentozole; perflubron; perfosfamida; álcool perililo; fenazinomicina; fenilacetato; inibidores de fosfatase; picibanil; cloridrato de pilocarpina; pirarrubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inibidor de activador de plasminogénio; complexo de platina; compostos de platina; complexo de platina-triamina; porfimer sódico; porfiromicina; prednisona; propil-bis-acridona; prostaglandina J2; inibidores de proteassoma; imunomodulador baseado em proteína A; inibidor de proteína quinase C; inibidores de proteína quinase C, microalgal; inibidores de proteína tirosina-fosfatase; inibidores de purina-nucleósido-

fosforilase; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de hemoglobina-polioxi-etileno piridoxilado; antagonistas raf; raltitrexed; ramosetron; inibidores ras farnesil proteína transferase; inibidores ras; inibidor ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de rênio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; roituquina; romurtida; roquinimex; rubiginonea B1; ruboxilo; safingol; saintopina; SarCNU; sarcositol A; sargramostim; miéticos Sdi 1; semustina; inibidor 1 derivado de senescência; oligonucleótidos em sentido; inibidores de transdução de sinal; sizofiran; sobuzoxano; borocaptato de sódio; fenilacetato de sódio; solverol; proteína de ligação de somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongistatina 1; esqualamina; estipiamida; inibidores de estromelisina; sulfinosina; antagonista de péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; suainsonina; talimustina; metiodeto de tamoxifeno; taumomustina; tazaroteno; tecogalano sódico; tegafur; telurapirílio; inibidores de telomerase; temoporfina; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoietina; mimético de trombopoietina; timalfasina; agonista de receptor de timopoietina; timotrinano; hormona estimulante da tiróide; estanho-etil-etiopurpurina; tirapazamina; bicloreto de titanoceno; topsentina; toremifeno; inibidores de tradução; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inibidores de tirosina-quinase; tirfostinas; inibidores de UBC; ubenimex; factor inibidor de crescimento derivado de sino urogenital; antagonistas de receptor de uroquinase; vapreotida; variolina B; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozole; zanoterona; zeniplatina; zilascorb; e zinostatina estimalamero.

5.8. Tratamento de células assassinas naturais com compostos imunomoduladores

Células assassinas naturais isoladas, e.g., células PINK ou células assassinas naturais combinadas, como aqui descritas noutros locais, podem ser tratadas com um composto imunomodulador, e.g., postas em contacto com um composto imunomodulador, para melhorar a actividade antitumor da célula. Assim, é aqui proporcionado um método de aumento da

citotoxicidade de uma célula assassina natural para uma célula tumoral compreendendo pôr em contacto a célula assassina natural com um composto imunomodulador durante um tempo e numa concentração suficientes para a célula assassina natural demonstrar citotoxicidade aumentada em relação a uma célula tumoral em comparação com a célula assassina natural não posta em contacto com o composto imunomodulador. Noutra concretização, é aqui proporcionado um método de aumento da expressão de granzima B numa célula assassina natural compreendendo pôr em contacto a célula assassina natural com um composto imunomodulador durante um tempo e numa concentração suficientes para a célula assassina natural demonstrar expressão aumentada de granzima B em comparação com a célula assassina natural não posta em contacto com o composto imunomodulador. O composto imunomodulador pode ser qualquer composto descrito abaixo, *e.g.*, lenalidomida ou pomalidomida.

É também aqui proporcionado um método de aumento da citotoxicidade de uma população de células assassinas naturais, *e.g.*, células PINK ou células assassinas naturais combinadas, para uma pluralidade de células tumorais compreendendo pôr em contacto a população de células assassinas naturais com um composto imunomodulador durante um tempo e numa concentração suficientes para a população de células assassinas naturais demonstrar citotoxicidade detectavelmente aumentada em relação à referida pluralidade de células tumorais em comparação com um número equivalente de células assassinas naturais não postas em contacto com o composto imunomodulador. Noutra concretização, é aqui proporcionado um método de aumento da expressão de granzima B numa população de células assassinas naturais compreendendo pôr em contacto a população de células assassinas naturais com um composto imunomodulador durante um tempo e numa concentração suficientes para a população de células assassinas naturais exprimir uma quantidade detectavelmente aumentada de granzima B em comparação com um número equivalente de células assassinas naturais não postas em contacto com o composto imunomodulador. Numa concretização específica, a referida população de células assassinas naturais está contida nas células de perfusato placentário, *e.g.*, células nucleadas total a partir de perfusato placentário.

Em concretizações específicas das concretizações acima, as células assassinas naturais são células assassinas naturais intermédias placentárias (células PINK) CD56⁺, CD16⁻. Noutra concretização específica das concretizações acima, as células assassinas naturais são células assassinas naturais combinadas, *i.e.*, células assassinas naturais a partir de perfusato placentário e sangue do cordão umbilical correspondentes.

Noutra concretização específica, a referida pluralidade de células assassinas naturais, *e.g.*, células PINK ou células assassinas naturais combinadas, posta em contacto com o referido composto imunomodulador exprime um ou mais de BAX, CCL5, CCR5, CSF2, FAS, GUSB, IL2RA ou TNFRSF18 a um nível mais elevado do que um número equivalente das referidas células assassinas naturais não postas em contacto com o referido composto imunomodulador. Noutra concretização específica, a referida pluralidade de células assassinas naturais, *e.g.*, células PINK, posta em contacto com o referido composto imunomodulador exprime um ou mais de ACTB, BAX, CCL2, CCL3, CCL5, CCR5, CSF1, CSF2, ECE1, FAS, GNLY, GUSB, GZMB, IL1A, IL2RA, IL8, IL10, LTA, PRF1, PTGS2, SKI e TBX21 a um nível mais elevado do que um número equivalente das referidas células assassinas naturais não postas em contacto com o referido composto imunomodulador.

É também aqui proporcionado um método de aumento da citotoxicidade de uma população de células de perfusato placentário humanas, *e.g.*, células nucleadas totais a partir de perfusato placentário, em relação a uma pluralidade de células tumorais, compreendendo pôr em contacto as células de perfusato placentário com um composto imunomodulador durante um tempo e numa concentração suficientes para as células de perfusato placentário demonstrarem citotoxicidade detectavelmente aumentada em relação à referida pluralidade de células tumorais em comparação com um número equivalente de células de perfusato placentário não postas em contacto com o composto imunomodulador. Noutra concretização, é aqui proporcionado um método de aumento da expressão de granzima B numa população de células de perfusato placentário compreendendo pôr em contacto a população de células de perfusato placentário com um composto imunomodulador durante

um tempo e numa concentração suficientes para a população de células de perfusato placentário exprimir uma quantidade detectavelmente aumentada de granzima B em comparação com um número equivalente de células de perfusato placentário não postas em contacto com o composto imunomodulador.

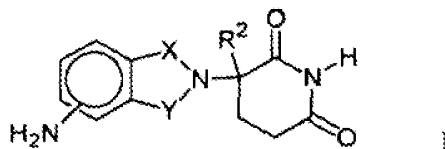
Compostos imunomoduladores podem ser quer comprados comercialmente quer preparados de acordo com os métodos descritos nas patentes ou publicações de patentes aqui referidas. Adicionalmente, composições opticamente puras podem ser sintetizadas assimetricamente ou resolvidas utilizando agentes de resolução conhecidos ou colunas quirais bem como outras técnicas padrão de química orgânica de síntese. Os compostos imunomoduladores podem ser racémicos, estereomericamente enriquecidos ou estereomericamente puros, e podem abranger seus sais farmacologicamente aceitáveis, solvatos e pró-fármacos.

Como aqui utilizado e a não ser que indicado de outro modo, o termo "compostos imunomoduladores" abrange moléculas orgânicas pequenas que acentuadamente inibem TNF- α , IL-1 β de monócito induzida por LPS e IL-12, e inibem parcialmente a produção de IL-6. Em exemplos específicos, os compostos imunomoduladores são lenalidomida, pomalidomida ou talidomida.

Exemplos específicos de compostos imunomoduladores, incluem, mas não estão limitados a, derivados de ciano e carboxi de estirenos substituídos tais como os revelados na Patente dos E.U.A. N.º 5 929 117; 1-oxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidin-3-il)isoindolinas e 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidina-3-il)isoindolinas tais como as descritas nas Patentes dos E.U.A. N.ºs 5 874 448 e 5 955 476; as 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisoindolinas tetra substituídas descritas na Patente dos E.U.A. N.º 5 798 368; 1-oxo e 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)isoindolinas (e.g., derivados de 4-metilo de talidomida), incluindo, mas não limitadas a, as reveladas nas Patentes dos E.U.A. N.ºs 5 635 517, 6 476 052, 6 555 554 e 6 403 613; 1-oxo e 1,3-dioxoisoindolinas substituídas na posição 4 ou 5 do anel de indolina (e.g., ácido 4-(4-amino-1,3-dioxoisoindolina-2-il)-4-carbamoilbutanóico) descritas na Patente dos E.U.A. N.º 6 380 239; isoindolina-1-ona e isoindolina-1,3-diona

substituídas na posição 2 com 2,6-dioxo-3-hidroxipiperidin-5-ilo (e.g., 2-(2,6-dioxo-3-hidroxi-5-fluoropiperidin-5-il)-4-aminoisoindolin-1-ona) descritas na Patente dos E.U.A. N.º 6 458 810; uma classe de amidas cíclicas não polipeptídicas reveladas nas Patentes dos E.U.A. N.ºs 5 698 579 e 5 877 200; aminotalidomida, bem como análogos, produtos de hidrólise, metabolitos, derivados e precursores de aminotalidomida, e 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)ftalimidas substituídas e 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisoindoles substituídos tais como os descritos nas Patentes dos E.U.A. N.ºs 6 281 230 e 6 316 471; e compostos de isoindole-imida tais como os descritos na Publicação de Patente dos E.U.A. N.º 2003/0045552 A1, Patente dos E.U.A. N.º 7 091 353, e WO 02/059106. Os compostos imunomoduladores não incluem talidomida.

Em certas concretizações, os compostos imunomoduladores são 1-oxo- e 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)isoindolinas substituídas com amino no anel benzo como descrito na Patente dos E.U.A. N.º 5 635 517. Estes compostos têm a estrutura I:

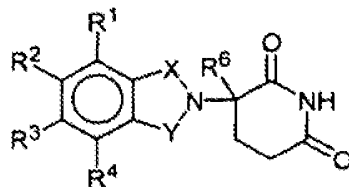


na qual um de X e Y é C=O, o outro de X e Y é C=O ou CH₂, e R² é hidrogénio ou alquilo inferior, em particular metilo. Compostos imunomoduladores específicos incluem, mas não estão limitados a:

- 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina;
- 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-5-aminoisoindolina;
- 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-6-aminoisoindolina;
- 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-7-aminoisoindolina;
- 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina; e
- 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-5-aminoisoindolina.

Outros compostos imunomoduladores específicos pertencem a uma classe de 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)ftalimidas substituídas e 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisoindoles

substituídos, tais como os descritos nas Patentes dos E.U.A. N.ºs 6 281 230, 6 316 471, 6 335 349 e 6 476 052, e na WO 98/03502. Compostos representativos têm a fórmula:



na qual:

um de X e Y é C=O e o outro de X e Y é C=O ou CH₂;

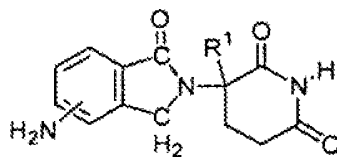
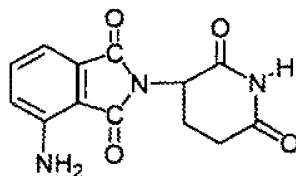
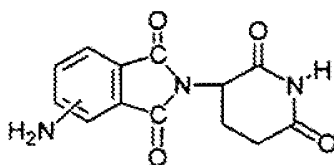
(i) cada um de R¹, R², R³ e R⁴, independentemente dos outros, é halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono ou alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono ou (ii) um de R¹, R², R³ e R⁴ é -NHR⁵ e os restantes de R¹, R², R³ e R⁴ são hidrogénio;

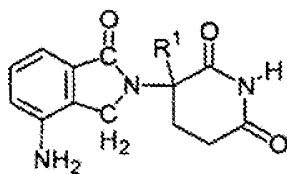
R⁵ é hidrogénio ou alquilo de 1 a 8 átomos de carbono;

R⁶ é hidrogénio, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzilo ou halo;

desde que R⁶ seja outro que não hidrogénio se X e Y forem C=O e (i) cada um de R¹, R², R³ e R⁴ é fluoro ou (ii) um de R¹, R², R³ ou R⁴ é amino.

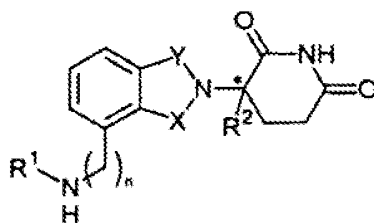
Compostos representativos desta classe têm as fórmulas:





onde R^1 é hidrogénio ou metilo. Numa concretização separada, é abrangida a utilização de formas enantiomericamente puras (e.g. enantiómeros (R) ou (S) opticamente puros) destes compostos.

Ainda outros compostos imunomoduladores específicos pertencem a uma classe de isoindole-imidas reveladas nas Publicações do Pedidos de Patente dos E.U.A. N.ºs US 2003/0096841 e US 2003/0045552, e WO 02/059106. Compostos representativos têm a fórmula II:



II

e seus sais farmacologicamente aceitáveis, hidratos, solvatos, clatratos, enantiómeros, diastereómeros, racematos e misturas de estereoisómeros, onde:

um de X e Y é C=O e o outro é CH₂ ou C=O;

R^1 é H, (C₁-C₈)alquilo, (C₃-C₇)cicloalquilo, (C₂-C₈)alcenilo, (C₂-C₈)alcinilo, benzilo, arilo, (C₀-C₄)alquil-(C₁-C₆)heterocicloalquilo, (C₀-C₄)alquil-(C₂-C₅)heteroarilo, C(O)R³, C(S)R³, C(O)OR⁴, (C₁-C₈)alquil-N(R⁶)₂, (C₁-C₈)alquil-OR⁵, (C₁-C₈)alquil-C(O)OR⁵, C(O)NHR³, C(S)NHR³, C(O)NR³R^{3'}, C(S)NR³R^{3'} ou (C₁-C₈)alquil-O(CO)R⁵;

R^2 é H, F, benzilo, (C₁-C₈)alquilo, (C₂-C₈)alcenilo ou (C₂-C₈)alcinilo;

R^3 e $R^{3'}$ são independentemente (C₁-C₈)alquilo, (C₃-C₇)cicloalquilo, (C₂-C₈)alcenilo, (C₂-C₈)alcinilo, benzilo, arilo, (C₀-C₄)alquil-(C₁-C₆)heterocicloalquilo, (C₀-C₄)alquil-(C₂-C₅)heteroarilo, (C₀-C₃)alquil-N(R⁶)₂, (C₁-C₈)alquil-OR⁵, (C₁-C₈)alquil-C(O)OR⁵, (C₁-C₈)alquil-O(CO)R⁵ ou C(O)OR⁵;

R^4 é (C_1-C_8) alquilo, (C_2-C_8) alcenilo, (C_2-C_8) alcinilo, (C_1-C_4) alquil-OR⁵, benzilo, arilo, (C_0-C_4) alquil- (C_1-C_6) heterocicloalquilo ou (C_0-C_4) alquil- (C_2-C_5) heteroarilo;

R^5 é (C_1-C_8) alquilo, (C_2-C_8) alcenilo, (C_2-C_8) alcinilo, benzilo, arilo ou (C_2-C_5) heteroarilo;

cada ocorrência de R^6 é independentemente H, (C_1-C_8) alquilo, (C_2-C_8) alcenilo, (C_2-C_8) alcinilo, benzilo, arilo, (C_2-C_5) heteroarilo ou (C_0-C_8) alquil-C(O)O-R⁵, ou os grupos R^6 podem unir-se para formar um grupo heterocicloalquilo;

n é 0 ou 1; e

* representa um centro de carbono quiral.

Em compostos específicos de fórmula II, quando n é 0 então R^1 é (C_3-C_7) cicloalquilo, (C_2-C_8) alcenilo, (C_2-C_8) alcinilo, benzilo, arilo, (C_0-C_4) alquil- (C_1-C_6) heterocicloalquilo, (C_0-C_4) alquil- (C_2-C_5) heteroarilo, C(O)R³, C(O)OR⁴, (C_1-C_8) alquil-N(R⁶)₂, (C_1-C_8) alquil-OR⁵, (C_1-C_8) alquil-C(O)OR⁵, C(S)NHR³ ou (C_1-C_8) alquil-O(CO)R⁵;

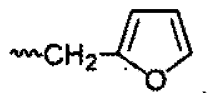
R^2 é H ou (C_1-C_8) alquilo; e

R^3 é (C_1-C_8) alquilo, (C_3-C_7) cicloalquilo, (C_2-C_8) alcenilo, (C_2-C_8) alcinilo, benzilo, arilo, (C_0-C_4) alquil- (C_1-C_6) heterocicloalquilo, (C_0-C_4) alquil- (C_2-C_5) heteroarilo, (C_5-C_8) alquil-N(R⁶)₂, (C_0-C_8) alquil-NH-C(O)O-R⁵, (C_1-C_8) alquil-OR⁵, (C_1-C_8) alquil-C(O)OR⁵, (C_1-C_8) alquil-O(CO)R⁵ ou C(O)OR⁵; e as outras variáveis têm as mesmas definições.

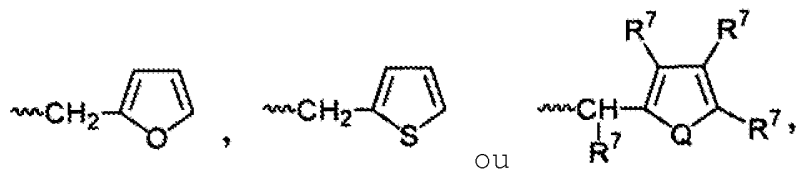
Noutros compostos específicos de fórmula II, R^2 é H ou (C_1-C_4) alquilo.

Noutros compostos específicos de fórmula II, R^1 é (C_1-C_8) alquilo ou benzilo.

Noutros compostos específicos de fórmula II, R^1 é H, (C_1-C_8) alquilo, benzilo, CH₂OCH₃, CH₂CH₂OCH₃ ou



Noutra concretização dos compostos de fórmula II, R^1 é



onde Q é O ou S, e cada ocorrência de R^7 é independentemente H, (C_1-C_8) alquilo, (C_3-C_7) cicloalquilo, (C_2-C_8) alcenilo, (C_2-C_8) alcinilo, benzilo, arilo, halogéneo, (C_0-C_4) alquil- (C_1-C_6) heterocicloalquilo, (C_0-C_4) alquil- (C_2-C_5) heteroarilo, (C_0-C_8) alquil- $N(R^6)_2$, (C_1-C_8) alquil- OR^5 , (C_1-C_8) alquil- $C(O)OR^5$, (C_1-C_8) alquil- $O(CO)R^5$ ou $C(O)OR^5$, ou ocorrências adjacentes de R^7 podem ser consideradas em conjunto para formar um anel arilo ou alquilo bicíclico.

Noutros compostos específicos de fórmula II, R^1 é $C(O)R^3$.

Noutros compostos específicos de fórmula II, R^3 é (C_0-C_4) alquil- (C_2-C_5) heteroarilo, (C_1-C_8) alquilo, arilo ou (C_0-C_4) alquil- OR^5 .

Noutros compostos específicos de fórmula II, heteroarilo é piridilo, furilo ou tienilo.

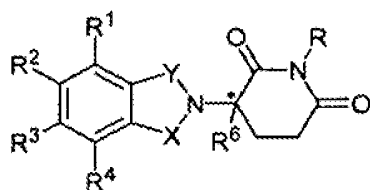
Noutros compostos específicos de fórmula II, R^1 é $C(O)OR^4$.

Noutros compostos específicos de fórmula II, o H de $C(O)NHC(O)$ pode estar substituído por (C_1-C_4) alquilo, arilo ou benzilo.

Exemplos adicionais dos compostos nesta classe incluem, mas não estão limitados a: [2-(2,6-dioxo-piperidin-3-il)-1,3-dioxo-2,3-di-hidro-1H-isoindol-4-ilmetil]-amida; éster de terc-butilo de ácido (2-(2,6-dioxo-piperidin-3-il)-1,3-dioxo-2,3-di-hidro-1H-isoindol-4-ilmetil)-carbâmico; 4-(aminometil)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolina-1,3-diona; N-(2-(2,6-dioxo-piperidin-3-il)-1,3-dioxo-2,3-di-hidro-1H-isoindol-4-ilmetil)-acetamida; N-{(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil}ciclopropil-carboxamida; 2-cloro-N-{(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil}acetamida; N-(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)-3-piridilcarboxamida;

3-{1-oxo-4-(benzilamino)isoindolin-2-il}piperidina-2,6-diona;
 2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-4-(benzilamino)isoindolina-1,3-diona;
 N-{(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil}propanamida;
 N-{(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil}-3-piridilcarboxamida;
 N-{(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil}heptanamida;
 N-{(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil}-2-furilcarboxamida;
 acetato de {N-(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)carbamoil}metilo;
 N-(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)pentanamida;
 N-(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)-2-tienilcarboxamida;
 N-{[2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il]metil}(butilamino)carboxamida;
 N-{[2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il]metil}(octilamino)-carboxamida;
 e N-{[2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il]metil}(benzilamino)carboxamida.

Ainda outros compostos imunomoduladores específicos pertencem a uma classe de isoindole-imidas reveladas na Publicação do Pedido de Patente dos E.U.A. N.º 2002/0045643, Publicação Internacional N.º WO 98/54170, e Patente dos E.U.A. N.º 6 395 754. Compostos representativos têm a fórmula III:



III

e seus sais farmaceuticamente aceitáveis, hidratos, solvatos, clatratos, enantiómeros, diastereómeros, racematos e misturas de estereoisómeros, onde:

um de X e Y é C=O e o outro é CH₂ ou C=O;

R é H ou CH₂OCOR';

(i) cada um de R¹, R², R³ ou R⁴, independentemente dos outros, é halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono ou alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, ou (ii) um de R¹, R², R³ ou R⁴ é nitro ou -NHR⁵ e os restantes de R¹, R², R³ ou R⁴ são hidrogénio;

R⁵ é hidrogénio ou alquilo de 1 a 8 carbonos;

R⁶ é hidrogénio, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro ou fluoro;

R^1 é $R^7-CHR^{10}-N(R^8R^9)$;

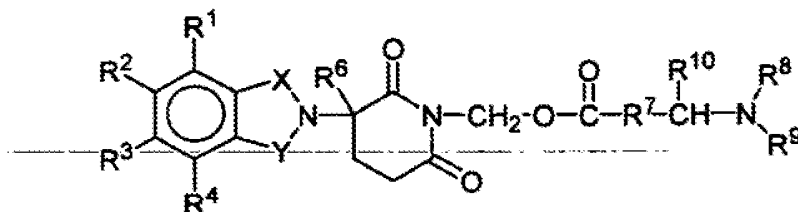
R^7 é m-fenileno ou p-fenileno ou $-(C_nH_{2n})-$ no qual n tem um valor de 0 a 4;

cada um de R^8 e R^9 considerado independentemente do outro é hidrogénio ou alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, ou R^8 e R^9 considerados em conjunto são tetrametileno, pentametileno, hexametileno ou $-CH_2CH_2X_1CH_2CH_2-$ no qual X_1 é $-O-$, $-S-$ ou $-NH-$;

R^{10} é hidrogénio, alquilo de até 8 átomos de carbono ou fenilo; e

* representa um centro de carbono quiral.

Outros compostos representativos têm a fórmula:



onde:

um de X e Y é C=O e o outro de X e Y é C=O ou CH₂;

(i) cada um de R^1 , R^2 , R^3 ou R^4 , independentemente dos outros, é halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono ou alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, ou (ii) um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é $-NHR^5$ e os restantes de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são hidrogénio;

R^5 é hidrogénio ou alquilo de 1 a 8 átomos de carbono;

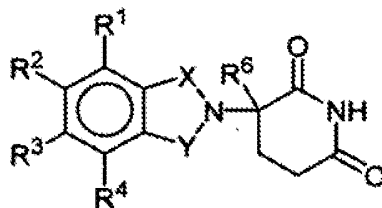
R^6 é hidrogénio, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro ou fluoro;

R^7 é m-fenileno ou p-fenileno ou $-(C_nH_{2n})-$ no qual n tem um valor de 0 a 4;

cada um de R^8 e R^9 considerado independentemente do outro é hidrogénio ou alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, ou R^8 e R^9 considerados em conjunto são tetrametileno, pentametileno, hexametileno ou $-CH_2CH_2X^1CH_2CH_2-$ no qual X^1 é $-O-$, $-S-$ ou $-NH-$;

R^{10} é hidrogénio, alquilo de até 8 átomos de carbono ou fenilo.

Outros compostos representativos têm a fórmula:



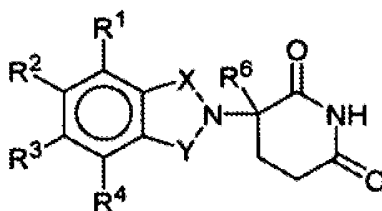
na qual

um de X e Y é C=O e o outro de X e Y é C=O ou CH₂;

cada um de R¹, R², R³ e R⁴, independentemente dos outros, é halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, ou alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono ou (ii) um de R¹, R², R³ e R⁴ é nitro ou amino protegido e os restantes de R¹, R², R³ e R⁴ são hidrogénio; e

R⁶ é hidrogénio, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro ou fluoro.

Outros compostos representativos têm a fórmula:



na qual:

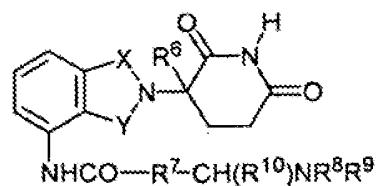
um de X e Y é C=O e o outro de X e Y é C=O ou CH₂;

(i) cada um de R¹, R², R³ e R⁴, independentemente dos outros, é halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono ou alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, ou (ii) um de R¹, R², R³ e R⁴ é -NHR⁵ e os restantes de R¹, R², R³ e R⁴ são hidrogénio;

R⁵ é hidrogénio, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono ou CO-R⁷-CH(R¹⁰)NR⁸R⁹ no qual cada um de R⁷, R⁸, R⁹ e R¹⁰ é como aqui definido; e

R⁶ é alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro ou fluoro.

Exemplos específicos dos compostos têm a fórmula:



na qual:

um de X e Y é C=O e o outro de X e Y é C=O ou CH₂;

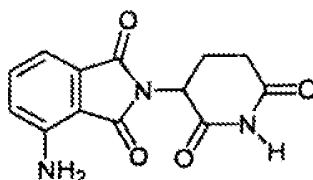
R⁶ é hidrogénio, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzilo, cloro ou fluoro;

R⁷ é m-fenileno, p-fenileno ou -(C_nH_{2n})- no qual n tem um valor de 0 a 4;

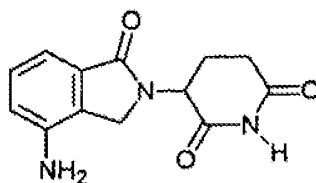
cada um de R⁸ e R⁹ considerado independentemente do outro é hidrogénio ou alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, ou R⁸ e R⁹ considerados em conjunto são tetrametileno, pentametileno, hexametileno ou -CH₂CH₂X¹CH₂CH₂- no qual X¹ é -O-, -S- ou -NH-; e

R¹⁰ é hidrogénio, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono ou fenilo.

Os compostos imunomoduladores mais preferidos são 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolina-1,3-diona e 3-(4-amino-1-oxo-1,3-di-hidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona. Os compostos podem ser obtidos através de métodos de síntese padrão (ver e.g., Patente dos Estados Unidos N.º 5 635 517). Os compostos estão disponíveis na Celgene Corporation, Warren, NJ. A 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolina-1,3-diona tem a estrutura química seguinte:



O composto 3-(4-amino-1-oxo-1,3-di-hidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona tem a estrutura química seguinte:



Noutra concretização, compostos imunomoduladores específicos abrangem formas polimórficas de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-di-hidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona tais como as Formas A, B, C, D, E, F, G e H reveladas na Publicação dos E.U.A. N.º US 2005/0096351 A1. Por exemplo, a Forma A de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-di-hidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona é um material cristalino não solvatado que pode ser obtido a partir de sistemas de solvente não aquoso. A Forma A tem um padrão de difracção de raios X de pó compreendendo picos significativos a aproximadamente 8, 14,5, 16, 17,5, 20,5, 24 e 26 graus 2θ , e tem um máximo de temperatura de fusão de calorimetria de varrimento diferencial de cerca de 270°C. A Forma A é fracamente ou não higroscópica e parece ser o polimorfo anidro mais estável termodinamicamente de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-di-hidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona até agora identificado.

A Forma B de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-di-hidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona é um material cristalino hemi-hidratado que pode ser obtido a partir de vários sistemas de solvente, incluindo, mas não limitados a, hexano, tolueno e água. A Forma B tem um padrão de difracção de raios X de pó compreendendo picos significativos a aproximadamente 16, 18, 22 e 27 graus 2θ , e tem endotérmicas a partir da curva de DSC de cerca de 146 e 268°C, que são desidratação e fusão identificadas por experiências de microscopia de placa quente. Estudos de interconversão mostram que a Forma B se converte na Forma E em sistemas de solvente aquoso, e se converte noutras formas em acetona e noutros sistemas anidros.

A Forma C de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-di-hidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona é um material cristalino hemi-solvatado que pode ser obtido a partir de solventes tais como, mas não limitados a, acetona. A Forma C tem um padrão de difracção de raios X de pó compreendendo picos significativos a aproximadamente 15,5 e 25 graus 2θ , e tem um máximo de

temperatura de fusão de calorimetria de varrimento diferencial de cerca de 269°C. A Forma C é não higroscópica abaixo de cerca de 85% de HR, mas pode-se converter na Forma B a humidades relativas mais elevadas.

A Forma D de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-di-hidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona é um polimorfo solvatado cristalino preparado a partir de uma mistura de acetonitrilo e água. A Forma D tem um padrão de difracção de raios X de pó compreendendo picos significativos a aproximadamente 27 e 28 graus 2θ , e tem um máximo de temperatura de fusão de calorimetria de varrimento diferencial de cerca de 270°C. A Forma D é quer fracamente quer não higroscópica, mas converter-se-á tipicamente na Forma B quando submetida a humidades relativas mais elevadas.

A Forma E de 3-(4-amino-1-oxo-1,3 di-hidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona é um material cristalino di-hidratado que pode ser obtido agitando em suspensão 3-(4-amino-1-oxo-1,3-di-hidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona em água e por uma evaporação lenta de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-di-hidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona num sistema de solvente com uma proporção de cerca de 9:1 de acetona:água. A Forma E tem um padrão de difracção de raios X de pó compreendendo picos significativos a aproximadamente 20, 24,5 e 29 graus 2θ , e tem um máximo de temperatura de fusão de calorimetria de varrimento diferencial de cerca de 269°C. A Forma E pode-se converter na Forma C num sistema de solvente de acetona e na Forma G num sistema de solvente de THF. Em sistemas de solvente aquoso, a Forma E parece ser a forma mais estável. Experiências de dessolvatação realizadas com a Forma E mostram que após aquecimento a cerca de 125°C durante cerca de 5 minutos, a Forma E pode-se converter na Forma B. Por aquecimento a 175°C durante cerca de cinco minutos, a Forma B pode-se converter na Forma F.

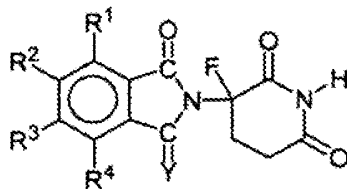
A Forma F de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-di-hidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona é um material cristalino não solvatado, que pode ser obtido a partir da desidratação da Forma E. A Forma F tem um padrão de difracção de raios X de pó compreendendo picos significativos a aproximadamente 19, 19,5

e 25 graus 2° , e tem um máximo de temperatura de fusão de calorimetria de varrimento diferencial de cerca de 269°C.

A Forma G de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-di-hidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona é um material cristalino não solvatado que pode ser obtida a partir das formas B e E agitadas em suspensão num solvente tal como, mas não limitado a, tetra-hidrofurano (THF). A Forma G tem um padrão de difracção de raios X de pó compreendendo picos significativos a aproximadamente 21, 23 e 24,5 graus 2° , e tem um máximo de temperatura de fusão de calorimetria de varrimento diferencial de cerca de 267°C.

A Forma H de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-di-hidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona é um material cristalino parcialmente hidratado (cerca de 0,25 moles) que pode ser obtido por exposição da Forma E a 0% de humidade relativa. A Forma H tem um padrão de difracção de raios X de pó compreendendo picos significativos a aproximadamente 15, 26 e 31 graus 2° , e tem um máximo de temperatura de fusão de calorimetria de varrimento diferencial de cerca de 269°C.

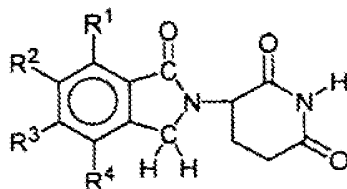
Outros compostos imunomoduladores específicos utilizáveis nos métodos aqui proporcionadas incluem, mas não estão limitados a, 1-oxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidin-3-il)isoindolinas e 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidina-3-il)isoindolinas tais como os descritos nas Patentes dos E.U.A. N.ºs 5 874 448 e 5 955 476. Compostos representativos têm a fórmula:



onde Y é oxigénio ou 2H e

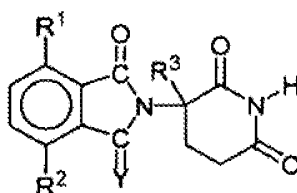
cada um de R¹, R², R³ e R⁴, independentemente dos outros, é hidrogénio, halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono ou amino.

Outros compostos imunomoduladores específicos utilizáveis nos métodos aqui proporcionados incluem, mas não estão limitados a, as 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisoindolinas tetra substituídas descritas in Patente dos E.U.A. N.º 5 798 368. Compostos representativos têm a fórmula:



onde cada um de R¹, R², R³ e R⁴, independentemente dos outros, é halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono ou alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono.

Outros compostos imunomoduladores específicos que podem ser utilizados nos métodos aqui proporcionadas incluem, mas não estão limitados a, 1-oxo e 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)isoindolinas reveladas Patente dos E.U.A. N.º 6 403 613. Compostos representativos têm a fórmula:



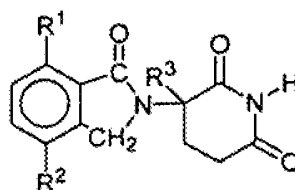
na qual

Y é oxigénio ou 2H,

um primeiro de R¹ e R² é halo, alquilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, ciano ou carbamoilo, o segundo de R¹ e R², independentemente do primeiro, é hidrogénio, halo, alquilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, ciano ou carbamoilo, e

R³ é hidrogénio, alquilo ou benzilo.

Exemplos específicos dos compostos têm a fórmula:

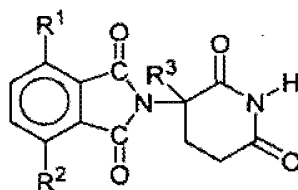


onde um primeiro de R^1 e R^2 é halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino no qual cada alquilo tem de 1 a 4 átomos de carbono, ciano ou carbamoilo,

o segundo de R^1 e R^2 , independentemente do primeiro, é hidrogénio, halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, alquilamino no qual o alquilo tem de 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino no qual cada alquilo tem de 1 a 4 átomos de carbono, ciano ou carbamoilo, e

R^3 é hidrogénio, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono ou benzilo. Exemplos específicos incluem, mas não estão limitados a, 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-metilisoindolina.

Outros compostos que podem ser utilizados nos métodos aqui proporcionadas têm a fórmula:

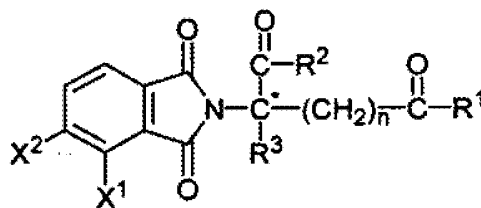


onde um primeiro de R^1 e R^2 é halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino no qual cada alquilo tem de 1 a 4 átomos de carbono, ciano ou carbamoilo,

o segundo de R^1 e R^2 , independentemente do primeiro, é hidrogénio, halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, alquilamino no qual o alquilo tem de 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino no qual cada alquilo tem de 1 a 4 átomos de carbono, ciano ou carbamoilo, e

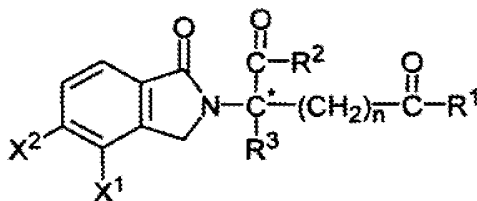
R^3 é hidrogénio, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono ou benzilo.

Outros compostos imunomoduladores específicos que podem ser utilizados nos métodos aqui proporcionadas incluem, mas não estão limitados a, 1-oxo e 1,3-dioxoisindolinas substituídas na posição 4 ou 5 do anel indolina descritas na Patente dos E.U.A. N.º 6 380 239 e Publicação do Pedido de Patente dos E.U.A. N.º 2006/0084815. Compostos representativos têm a fórmula:



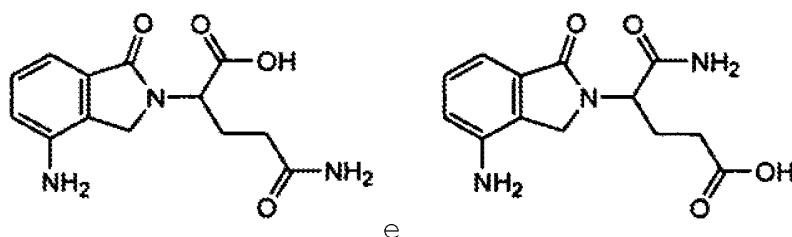
na qual o átomo de carbono designado C* constitui um centro de quiralidade (quando n não é zero e R¹ não é o mesmo que R²); um de X¹ e X² é amino, nitro, alquilo de um a seis carbonos ou NH-Z, e o outro de X¹ ou X² é hidrogénio; cada um de R¹ e R² independente do outro é hidroxí ou NH-Z; R³ é hidrogénio, alquilo de um a seis carbonos, halo ou haloalquilo; Z é hidrogénio, arilo, alquilo de um a seis carbonos, formilo ou acilo de um a seis carbonos; e n tem um valor de 0, 1 ou 2; desde que se X¹ for amino e n for 1 ou 2, então R¹ e R² não são ambos hidroxí; e os seus sais.

Compostos adicionais que podem ser utilizados nos métodos aqui proporcionados têm a fórmula:

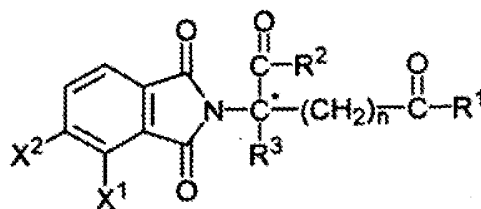


na qual o átomo de carbono designado C* constitui um centro de quiralidade quando n não é zero e R¹ não é R²; um de X¹ e X² é amino, nitro, alquilo de um a seis carbonos ou NH-Z, e o outro de X¹ ou X² é hidrogénio; cada um de R¹ e R² independente do outro é hidroxí ou NH-Z; R³ é alquilo de um a seis carbonos, halo ou hidrogénio; Z é hidrogénio, arilo ou um alquilo ou acilo de um a seis carbonos; e n tem um valor de 0, 1 ou 2.

Exemplos específicos de compostos que podem ser utilizados nos métodos aqui proporcionadas incluem, mas não estão limitados a, ácido 2-(4-amino-1-oxo-1,3-di-hidro-isoindol-2-il)-4-carbamoil-butírico e ácido 4-(4-amino-1-oxo-1,3-di-hidro-isoindol-2-il)-4-carbamoil-butírico, que têm as estruturas seguintes, respectivamente, e seus sais farmacologicamente aceitáveis, solvatos, pró-fármacos e estereoisómeros:



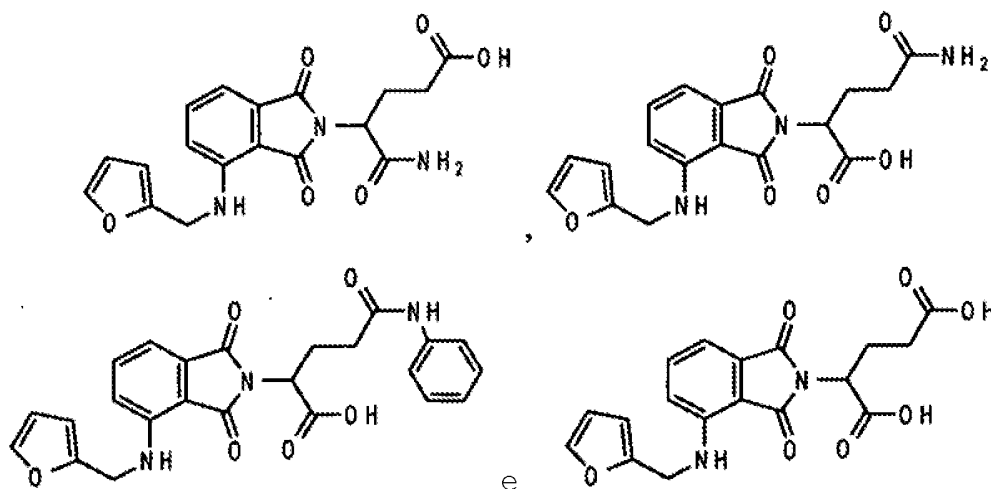
Outros compostos representativos têm a fórmula:



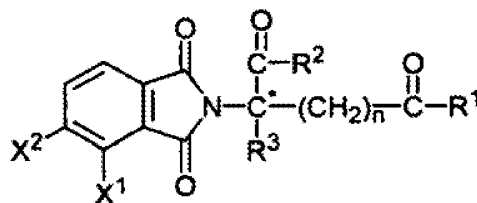
na qual o átomo de carbono designado C* constitui um centro de quiralidade quando n não é zero e R¹ não é R²; um de X¹ e X² é amino, nitro, alquilo de um a seis carbonos ou NH-Z, e o outro de X¹ ou X² é hidrogénio; cada um de R¹ e R² independente do outro é hidroxil ou NH-Z; R³ é alquilo de um a seis carbonos, halo ou hidrogénio; Z é hidrogénio, arilo ou um alquilo ou acilo de um a seis carbonos; e n tem um valor de 0, 1 ou 2; e os seus sais.

Exemplos específicos incluem, mas não estão limitados a, ácido 4-carbamoil-4-{4-[(furan-2-il-metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-di-hidro-isoindol-2-il}-butírico, ácido 4-carbamoil-2-{4-[(furan-2-il-metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-di-hidro-isoindol-2-il}-butírico, ácido 2-{4-[(furan-2-il-metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-di-hidro-isoindol-2-il}-4-fenilcarbamoil-butírico e ácido 2-{4-[(furan-2-il-metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-di-hidro-isoindol-2-il}-pentanodióico, que têm as estruturas seguintes,

respectivamente, e seus sais farmacologicamente aceitáveis, solvatos, pró-fármacos e estereoisómeros:



Outros exemplos específicos dos compostos têm a fórmula:



onde um de X^1 e X^2 é nitro ou $NH-Z$, e o outro de X^1 ou X^2 é hidrogénio;

cada um de R^1 e R^2 independente do outro é hidroxil ou $NH-Z$;

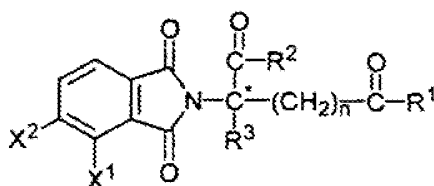
R^3 é alquilo de um a seis carbonos, halo ou hidrogénio;

Z é hidrogénio, fenilo, um acilo de um a seis carbonos ou um alquilo de um a seis carbonos; e

n tem um valor de 0, 1 ou 2;

desde que se um de X^1 e X^2 for nitro, e n for 1 ou 2, então R^1 e R^2 são outro que não hidroxil; e

se $-COR^2$ e $-(CH_2)_nCOR^1$ são diferentes, o átomo de carbono designado C^* constitui um centro de quiralidade. Outros compostos representativos têm a fórmula:



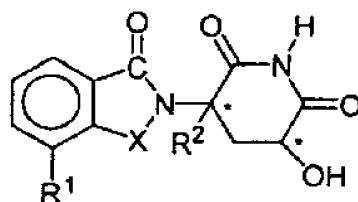
onde um de X^1 e X^2 é alquilo de um a seis carbonos;
 cada um de R^1 e R^2 , independente do outro, é hidroxí ou
 NH-Z;

R^3 é alquilo de um a seis carbonos, halo ou hidrogénio;
 Z é hidrogénio, fenilo, um acilo de um a seis carbonos ou
 um alquilo de um a seis carbonos; e

n tem um valor de 0, 1 ou 2; e

se $-COR^2$ e $-(CH_2)_nCOR^1$ forem diferentes, o átomo de carbono
 designado C* constitui um centro de quiralidade.

Ainda outros compostos imunomoduladores específicos
 incluem, mas não estão limitados a, isoindolina-1-ona e
 isoindolina-1,3-diona substituídas na posição 2 com 2,6-dioxo-
 3-hidroxipiperidin-5-ilo descritas na Patente dos E.U.A. N.º
 6 458 810. Compostos representativos têm a fórmula:



onde:

os átomos de carbono designados * constituem centros de
 quiralidade;

X é $-C(O)-$ ou $-CH_2-$;

R^1 é alquilo de 1 a 8 átomos de carbono ou $-NHR^3$;

R^2 é hidrogénio, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono ou
 halogéneo; e

R^3 é hidrogénio,

alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, não substituído ou
 substituído com alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halo, amino,
 ou alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono,

cicloalquilo de 3 a 18 átomos de carbono,

fenilo, não substituído ou substituído com alquilo de 1
 a 8 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halo,
 amino ou alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono,

benzilo, não substituído ou substituído com alquilo de 1
 a 8 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halo,
 amino ou alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono, ou $-COR^4$ no
 qual

R⁴ é hidrogénio,

alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, não substituído ou substituído com alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halo, amino ou alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono,

cicloalquilo de 3 a 18 átomos de carbono,

fenilo, não substituído ou substituído com alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halo, amino ou alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono, ou

benzilo, não substituído ou substituído com alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halo, amino ou alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono.

Compostos aqui proporcionados podem ser quer adquiridos comercialmente quer preparados de acordo com os métodos descritos nas patentes ou publicações de patentes aqui reveladas. Adicionalmente, compostos opticamente puros podem ser sintetizados assimetricamente ou resolvidos utilizando agentes de resolução conhecidos ou colunas quirais bem como outras técnicas padrão de química orgânica de síntese.

Vários compostos imunomoduladores contêm um ou mais centros quirais, e podem existir como misturas racémicas de enantiómeros ou misturas de diastereómeros. É abrangida a utilização de formas estereomericamente puras destes compostos, bem como a utilização de misturas dessas formas. Por exemplo, em métodos e composições aqui proporcionadas, podem-se utilizar misturas compreendendo quantidades iguais ou não iguais dos enantiómeros de um composto imunomodulador particular. Estes isómeros podem ser sintetizados assimetricamente ou resolvidos utilizando técnicas padrão tais como colunas quirais ou agentes de resolução quirais. Ver, e.g., Jacques, J., *et al.*, *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley-Interscience, New York, 1981); Wilen, S. H., *et al.*, *Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, E. L., *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGraw-Hill, NY, 1962); e Wilen, S. H., *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN, 1972).

Será de notar que se existir uma discrepância entre uma estrutura ilustrada e um dado nome dessa estrutura, deve ser atribuída mais preponderância à estrutura ilustrada. Para além

disso, se a estereoquímica de uma estrutura ou de uma porção de uma estrutura não está indicada, por exemplo, por linhas a cheio ou a tracejado, a estrutura ou porção da estrutura deve ser interpretada como abrangendo todos os estereoisómeros da mesma.

5.9. Administração de células PINK, perfusato placentário humano ou células assassinas naturais combinadas

As células PINK, células de perfusato placentário humanas, células assassinas naturais combinadas, populações de células compreendendo estas células, ou suas combinações, podem ser administrados a um indivíduo, e.g., um indivíduo com células tumorais, e.g., um paciente de cancro, por qualquer via medicamente aceitável conhecida na especialidade, adequada para a administração de células vivas. Em várias concretizações, as células aqui proporcionadas podem ser implantadas cirurgicamente, injectadas, perfundidas, e.g., através de um cateter ou seringa, ou de outro modo administradas directamente ou indirectamente ao local necessitado de reparação ou melhoria. Numa concretização, as células são administradas a um indivíduo intravenosamente. Noutra concretização, as células são administradas ao indivíduo no local de um tumor, e.g., um tumor sólido. Numa concretização específica na qual o indivíduo tem um tumor em mais do que um local, as células são administradas a pelo menos dois, ou à totalidade, dos locais do tumor. Em certas outras concretizações, as células aqui proporcionadas, ou composições compreendendo as células, são administradas oralmente, nasalmente, intra-arterialmente, parentericamente, oftalmicamente, intramuscularmente, subcutaneamente, intraperitonealmente, intracerebralmente, intraventricularmente, intracerebroventricularmente, intratecalmente, intracisternalmente, intraespinalmente e/ou periespinalmente. Em certas concretizações específicas, as células são entregues através de agulhas e/ou cateteres intracranianos ou intravertebrais com ou sem dispositivos de bomba.

As células PINK, células de perfusato placentário humanas, células assassinas naturais combinadas, ou suas combinações, ou populações de células compreendendo estas

células, podem ser administradas a um indivíduo numa composição, e.g., uma matriz, hidrogel, armação, ou outros, que compreendem as células.

Numa concretização, as células são aqui proporcionadas semeadas sobre uma matriz natural, e.g., um biomaterial placentário tal como um material de membrana amniótica. Um tal material de membrana amniótica pode ser, e.g., membrana amniótica dissecada directamente a partir de uma placenta de mamífero; membrana amniótica fixada ou tratada por calor, membrana amniótica substancialmente seca (i.e., <20% H₂O), membrana coriónica, membrana coriónica substancialmente seca, membrana amniótica e coriónica substancialmente seca, e outros. Biomateriais placentários preferidos sobre os quais células estaminais placentárias podem ser semeadas são descritos em Hariri, Publicação do Pedido de Patente dos E.U.A. N.º 2004/0048796.

Noutra concretização, as células PINK, células de perfusato placentário humanas, células assassinas naturais combinadas, ou suas combinações, ou populações de células compreendendo estas células, são suspensas numa solução de hidrogel adequada para, e.g., injeção. Hidrogéis adequados para estas composições incluem péptidos auto-organizados, tais como RAD16. Numa concretização, uma solução de hidrogel compreendendo as células pode ser deixada endurecer, por exemplo num molde, para formar uma matriz possuindo células aí dispersas para implantação. As células numa tal matriz podem também ser cultivadas tal que as células são mitoticamente expandidas antes da implantação. O hidrogel pode ser, por exemplo, um polímero orgânico (natural ou sintético) que está reticulado através de ligações covalentes, iónicas ou de hidrogénio para criar uma estrutura de malha aberta tridimensional que aprisiona moléculas de água para formar um gel. Materiais para formação de hidrogel incluem polissacáridos tais como alginato e seus sais, péptidos, polifosfazinas e poliacrilatos, que são reticulados ionicamente, ou polímeros de bloco tais como copolímeros de bloco de poli(óxido de etileno)-polipropilenoglicol que são reticulados por temperatura ou pH, respectivamente. Em algumas concretizações, o hidrogel ou matriz do invento é biodegradável.

Em algumas concretizações do invento, a formulação compreende um gel polimerizável *in situ* (ver, e.g., Publicação do Pedido de Patente dos E.U.A. 2002/0022676; Anseth *et al.*, J. Control Release, 78(1-3):199-209 (2002); Wang *et al.*, Biomaterials, 24(22):3969-80 (2003)).

Em algumas concretizações, os polímeros são pelo menos parcialmente solúveis em soluções aquosas, tais como água, soluções salinas tamponadas ou soluções aquosas de álcool, que têm grupos laterais carregados, ou um seu sal iónico monovalente. Exemplos de polímeros possuindo grupos laterais ácidos que se podem fazer reagir com catiões são poli(fosfazenos), poli(ácidos acrílicos), poli(ácidos metacrílicos), copolímeros de ácido acrílico e ácido metacrílico, poli(acetato de vinilo) e polímeros sulfonados, tais como poliestireno sulfonado. Podem-se também usar polímeros possuindo grupos laterais ácidos formados por reacção de ácido acrílico ou ácido metacrílico e monómeros ou polímeros de éter de vinilo. Exemplos de grupos ácidos são grupos de ácido carboxílico, grupos de ácido sulfónico, grupos de álcool halogenado (preferivelmente fluorados), grupos OH fenólicos e grupos OH ácidos.

As células estaminais placentárias do invento ou suas coculturas podem ser semeadas sobre uma estrutura ou armação tridimensional e implantadas *in vivo*. Uma tal estrutura implantada em combinação com qualquer um ou mais de factores de crescimento, células, fármacos ou outros componentes que estimulam a formação de tecido ou de outro modo potenciam ou melhoram a prática do invento.

Exemplos de armações que podem ser utilizadas no presente invento incluem esteiras não tecidas, espumas porosas ou péptidos auto-organizados. As esteiras não tecidas podem ser formadas utilizando fibras constituídas de um copolímero sintético absorvível de ácidos glicólico e láctico (e.g., PGA/PLA) (VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N.J.). Como armações, podem-se também utilizar espumas compostas de, e.g., copolímero de poli(-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), formado por processos tais como congelação-secagem, ou liofilização (ver, e.g., Patente dos E.U.A. N.º 6 355 699).

Células estaminais placentárias do invento podem também ser semeadas sobre, ou postas em contacto com, um material cerâmico fisiologicamente aceitável incluindo, mas não limitado a, mono-, di-, tri-, alfa-tri-, beta-tri- e tetra-fosfato de cálcio, hidroxiapatite, fluoroapatites, sulfatos de cálcio, fluoretos de cálcio, óxidos de cálcio, carbonatos de cálcio, fosfatos de magnésio e cálcio, vidros biologicamente activos tais como BIOGLASS®, e suas misturas. Materiais cerâmicos biocompatíveis actualmente disponíveis comercialmente incluem SURGIBONE® (CanMedica Corp., Canada), ENDOBON® (Merck Biomaterial France, France), CEROS® (Mathys, AG, Bettlach, Suíça), e produtos de enxerto ósseo de colagénio mineralizado tais como HEALOS™ (DePuy, Inc., Raynham, MA) e VITOSS®, RHAKOSS™ e CORTOSS® (Orthovita, Malvern, Pa.). A estrutura pode ser uma mistura, formulação ou compósito de materiais naturais e/ou sintéticos.

Noutra concretização, células estaminais placentárias podem ser semeadas sobre, ou postas em contacto com, um feltro, que pode ser, e.g., composto de um fio multifilamento composto de um material bioabsorvível tal como copolímeros ou formulações de PGA, PLA, PCL ou ácido hialurónico.

As células estaminais placentárias do invento podem, noutra concretização, ser semeadas sobre armações de espuma que podem ser estruturas compósitas. Estas armações de espuma podem ser moldadas numa forma útil, tal como a de uma porção de uma estrutura específica no corpo a ser reparada, substituída ou aumentada. Em algumas concretizações, a estrutura é tratada, e.g., com ácido acético 0,1 M seguindo-se incubação em poli-lisina, PBS e/ou colagénio, antes da inoculação das células do invento de modo a melhorar a ligação das células. As superfícies externas de uma matriz podem ser modificadas para melhorar a ligação ou crescimento das células e a diferenciação de tecido, tal como revestimento da matriz a plasma, ou adição de uma ou mais proteínas (e.g., colagénios, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (e.g., sulfato de heparina, condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato, sulfato de dermatano, sulfato de queratina, etc.), uma matriz celular, e/ou outros

materiais tais como, mas não limitados a, gelatina, alginatos, ágar, agarose e gomas de planta, e outros.

Em algumas concretizações, a armação compreende, ou é tratada com, materiais que a tornam não trombogénica. Estes tratamentos e materiais podem também promover e manter o crescimento endotelial, a migração e a deposição de matriz extracelular. Exemplos destes materiais e tratamentos incluem mas não estão limitados a materiais naturais tais como proteínas da membrana basal tais como laminina e colagénio do Tipo IV, materiais sintéticos tais como EPTFE, e silicones de poliuretano-ureia segmentados, tais como PURSPAN™ (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif.). A armação pode também compreender agentes anti-trombóticos tais como heparina; as armações podem também ser tratadas para alterar a carga superficial (e.g., revestimento com plasma) antes da sementeira com células estaminais placentárias.

6. EXEMPLOS

6.1. Exemplo 1: Caracterização de células assassinas naturais intermédias derivadas de placenta a partir de perfusato placentário e de sangue do cordão umbilical

O presente exemplo demonstra o isolamento e cultura de células assassinas naturais a partir de perfusato placentário humano.

Isolamento de células assassinas naturais placentárias. Células assassinas naturais foram isoladas a partir de 8 unidades de perfusato placentário humano (HPP) e a partir de 4 unidades de sangue do cordão umbilical (UCB), utilizando micropérolas conjugadas com CD56. O isolamento de células PINK foi conduzido por selecção de pérolas magnéticas (Miltenyi Biotec). A placenta pós-parto foi sangrada e perfundida com cerca de 200 a cerca de 750 mL de solução de perfusão (solução de injeção de NaCl a 0,9% grau USP (N.º de cat. 68200-804, VWR). Colheu-se o perfusato não processado e processou-se para remover os eritrócitos. Células mononucleares a partir de HPP ou UCB foram lavadas uma vez com tampão de separação de células activadas por fluorescência (FACS) (RPMI 1640, sem vermelho de fenol, mais 5% de FBS), e depois centrifugadas a 1500 rpm

durante 6 minutos. Contou-se o número de células, e ressuspendeu-se o sedimento celular em 80 μ L de tampão por 10^7 células totais com 20 μ L de Micropérolas CD3 (N.º de catálogo 130-050-101, Miltenyi). Misturou-se bem o sistema e incubou-se durante 15 minutos a 4-8°C. Adicionaram-se 1-2 mL de tampão por 10^7 células totais, e depois centrifugou-se a mistura a 300xg durante 10 minutos. Removeu-se totalmente o sobrenadante por pipetagem. Ressuspendeu-se o sedimento celular até 10^8 células em 500 μ L e tampão e preparou-se para separação magnética. Colocou-se uma coluna LS (Miltenyi Biotec) no campo magnético de um separador de células MIDIMACS™ (Miltenyi Biotec), aplicaram-se 3 mL de tampão para enxaguar a coluna, e aplicou-se a suspensão de células/microesferas à coluna. Células CD3⁻ não marcadas, que passaram através da coluna e que incluíam células assassinas naturais, foram colhidas em conjunto com 2 x 3 mL de tampão de lavagem. Contaram-se as células CD3⁻, lavaram-se uma vez, depois coraram-se com micropérolas CD56 (Cat. #: 130-050-401, Miltenyi), e separaram-se/isolaram-se utilizando o mesmo protocolo que para a separação de micropérolas de CD3 descrita acima. Foi assim colhida uma população CD56⁺CD3⁻ e que estava pronta para análise adicional. O intervalo em percentagem de células assassinas naturais era 3,52 a 11,6 (mediana 6,04, média 5,22) em HPP, e 1,06 a 8,44 em UCB (mediana: 3,42, média: 4,2). A selecção de micropérolas CD56 de células assassinas naturais a partir de HPP produziu uma população que era aproximadamente 80% pura. Ver FIG. 1. Entre toda a população de células assassinas naturais CD56⁺, CD3⁻, o intervalo em percentagem de células assassinas naturais CD56⁺, CD16⁻ (isto é, células PINK) era 56,6 a 87,2 (mediana 74,2, média 65,5) a partir de HPP, e 53,7 a 96,6 (mediana 72,8) a partir de UCB. O intervalo em percentagem de células assassinas naturais CD56⁺, CD16⁺ era 12,8 a 43,3 (mediana 25,8, média 34,5) a partir de HPP, e 3,4 a 46,3 (mediana 27,3, média 33,4) para UCB.

Noutras experiências, células assassinas naturais foram isoladas utilizando um *kit* de selecção negativa magnética que visa antigénios de superfície celular sobre células sanguíneas humanas (CD3, CD4, CD14, CD19, CD20, CD36, CD66b, CD 123, HLA-DR, glicoforina A). Unidades criopreservadas de HPP e UCB foram descongeladas e diluídas 1:1 com meio Thaw (Meio RPMI 1640 (Catálogo #22400, Gibco) mais soro fetal de bovino inactivado

por calor (Catálogo #SH30070.03, Hyclone)) e centrifugadas a 1500 rpm durante 8 minutos. Removeu-se o sobrenadante e aplicou-se tratamento com cloreto de amônio para esgotar adicionalmente os eritrócitos; ressuspendeu-se cada unidade em aproximadamente 30 mL de tampão FACS arrefecido em gelo (RPMI 1640, sem vermelho de fenol, mais 5% de FBS), e depois adicionaram-se 60 mL de cloreto de amônio arrefecido em gelo (Catálogo #07850, Stem Cell), agitou-se a solução num vórtice e depois incubou-se em gelo durante 5 minutos. Lavaram-se depois as células mononucleares com tampão FACS 3 vezes e depois centrifugou-se a 1500 rpm durante 8 minutos. Contou-se o número de células e ressuspendeu-se o sedimento celular com 5×10^7 células vivas/mL em tampão RoboSep (Catálogo #20104, Stem Cell) adicionou-se mais solução 0,1 mg/mL de DNAase I (Catálogo #07900, Stem Cell) à suspensão de células, mexeu-se gentilmente com uma pipeta e incubou-se 15 minutos à temperatura ambiente antes do isolamento. Removeram-se os aglomerados da suspensão de células por filtração através de um coador de nylon de malha 40 μm (Catálogo #352340, BD Falcon) antes de prosseguir com o isolamento. O isolamento é automático pelo dispositivo RoboSep (Catálogo #20000, Stem Cell) e com o programa "Human NK Negative Selection 19055 and high recovery" (adição de cocktail 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$, adição de micropartículas 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$, incubações de 10 e 5 minutos, separações de 1 x 2,5 minutos) com Kit de enriquecimento em células NK humanas (Catálogo #19055, Stem Cell) incluindo cocktail de enriquecimento de células NK humanas de selecção negativa EasySep e micropartículas magnéticas EasySep. Foi assim colhida uma população $\text{CD56}^+\text{CD3}^-$ e que estava pronta para análise adicional.

Expansão de células assassinas naturais. Em geral, as células assassinas naturais foram expandidas como se segue. O Meio Inicial para cultura de células assassinas naturais foi preparado com base numa modificação de um protocolo descrito em Yssel *et al.*, *J. Immunol. Methods* 72(1):219-227 (1984) e Litwin *et al.*, *J. Exp. Med.* 178(4):1321-1326 (1993). Resumidamente, o Meio Inicial inclui IMDM (Invitrogen) com 10% de FCS (Hyclone), contendo os reagentes seguintes com concentração final de 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de transferrina (Sigma-Aldrich), 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de insulina (Sigma-Aldrich), 2×10^{-5} M de etanolamina (Sigma-Aldrich), 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido oleico (Sigma-

Aldrich), 1 µg/mL de ácido linoleico (Sigma-Aldrich), 0,2 µg/mL de ácido palmítico (Sigma-Aldrich), 2,5 µg/mL de BSA (Sigma-Aldrich) e 0,1 µg/mL de fito-hemaglutinina (PHA-P, Sigma-Aldrich). Ressuspenderam-se as células NK CD56⁺CD3⁻ com 2,5 x 10⁵ células vivas/mL de Meio Inicial mais 200 IU/mL de IL-2 (R&D Systems) em placa de 24 poços tratada para cultura de células ou num balão T. PBMC alogénicos tratados com Mitomicina C e células K562 (linha de células de leucemia mielógena crónica) foram ambas adicionadas ao Meio Inicial como células alimentadoras, para uma concentração final de 1 x 10⁶ per mL. Cultivaram-se as células NK durante 5-6 dias a 37°C em 5% de CO₂. Após 5-6 dias e depois a cada 3-4 dias adicionou-se à cultura um volume igual de Meio de Manutenção (IMDM com 10% de FCS, 2% de soro AB humano, antibióticos, L-glutamina e 400 unidades de IL-2 por mL). Colheram-se as células NK ao dia 21.

Caracterização de células assassinas naturais intermédias derivadas de placenta. Descongelaram-se HPP e CB correspondentes de um dador, e lavaram-se as células com tampão FACS (RPMI-1640 com 5% de FBS). As células assassinas naturais foram depois enriquecidas com micropérolas de CD56 utilizando o sistema de separação magnética ROBOSEP® (StemCell Technologies) conforme ensinado pelo fabricante. A população de células assassinas naturais enriquecidas em CD56 foi corada com os anticorpos seguintes (BD Bioscience se não indicado de outro modo) para caracterização imunofenotípica: anti-CD56 conjugado a PE-Cy-7, anti-CD3 APC Cy7, anti-CD16 FITC, anti-NKG2D APC, anti-NKp46 APC, anti-CD94 PE (R&D), anti-NKB1 PE, e anti-KIR-NKAT2 PE. CD94, NKG2D e NKp46 são marcadores ausentes, ou exibindo expressão reduzida, em progenitores de célula NK mas presentes em células NK totalmente diferenciadas. Ver Freud et al., "Evidence for Discrete States of Human Natural Killer Cell Differentiation In Vivo," *J. Exp. Med.* 203(4):1033-1043 (2006); Eagle & Trowsdale, "Promiscuity and the Single Receptor: NKG2D," *Nature Reviews Immunology* Publicado online em 3 de Agosto de 2007; Walzer et al., "Natural Killer Cells: From CD3-NKp46+ to Post-Genomics Meta-Analyses," *Curr. Opin Immunol.* 19:365-372 (2007). como se mostra na Tabela 1, a expressão de KIR3DL1, KIR2DL2/L3, NKG2D, NKp46 e CD94 não foi significativamente diferente entre uma população de células CD56⁺ enriquecida a partir de HPP e uma

população de células CD56⁺ correspondente-HLA a partir de sangue do cordão umbilical (CB).

Tabela 1. Percentagem de células NK portadoras de certas combinações de marcador. Média de 3 amostras.

	Média (%)		Valor p
	CB	HPP	
CD3-CD56+	0,6	0,7	0,799
CD3-CD56+CD16-	53,9	58,7	0,544
CD3-CD56+CD16+	46,1	41,3	0,544
CD3-CD56+KIR3DL1+	5,8	7,3	0,762
CD3-CD56+KIR2DL2/L3+	10,7	9,9	0,89
CD3-CD56+NKG2D+	60,3	58,5	0,865
CD3-CD56+CD94+	74,6	76,8	0,839

6.2. Exemplo 2: Caracterização de células assassinas naturais intermédias derivadas de placenta a partir de perfusato placentário combinado e de sangue do cordão umbilical

Misturaram-se células mononucleadas de sangue do cordão umbilical e perfusato placentário (combo) e lavou-se com tampão FACS (RPMI-1640 com 5% de FBS) uma vez e caracterizaram-se imunofenotipicamente utilizando os anticorpos listados na Tabela 2 numa BD FACSCanto (BD Biosciences). Os dados foram analisados pelo *software* FlowJo (Tree Star).

Tabela 2: Lista de anticorpos utilizados na caracterização imunofenotípica.

Item	Fornecedor	N.º de Cat.
FITC anti-hu CD3	BD Bioscience	555332
FITC anti-hu CD3	Miltenyi	130-080-401
APC-Cy7 anti-hu CD3	BD Bioscience	557832
FITC anti-hu CD16	BD Bioscience	555406
PE-Cy5 anti-hu CD16	BD Bioscience	555408
PE anti-hu CD56	BD Bioscience	555516

Item	Fornecedor	N.º de Cat.
PE anti-hu CD56	Miltenyi	130-090-755
PE-CY5 anti-hu CD56	BD Bioscience	555517
PE-Cy7 anti-hu CD56	BD Bioscience	557747
PE anti-hu CD94	R&D	FAB-1058P
PE anti-hu KIR-NKAT2 (2DL2/L3)	BD Bioscience	556071
PE anti-hu NKB1(3DL1)	BD Bioscience	555967
APC anti-hu NKG2D	BD Bioscience	558071
APC anti-hu NKp46	BD Bioscience	558051
PE anti-hu CD226	BD Bioscience	559789
PE anti-hu NKp44	BD Bioscience	558563
PE anti-hu NKp30	BD Bioscience	558407
PE anti-hu 2B4	BD Bioscience	550816
Isótipo FITC IgG1 de ratinho	BD Bioscience	340755
Isótipo FITC IgG2b de ratinho	BD Bioscience	556577
Isótipo PE IgG1 de ratinho	BD Bioscience	340761
Isótipo PE IgG2b de ratinho	BD Bioscience	555743
Isótipo PerCP IgG1 de ratinho	BD Bioscience	340762
Isótipo PE-Cy5 IgG2b de ratinho	BD Bioscience	555744
Isótipo APC IgG1 de ratinho	BD Bioscience	340754
Isótipo APC IgG2a de ratinho	BD Bioscience	555576
Isótipo APC-Cy7 IgG1 de ratinho	BD Bioscience	348802
Isótipo PE-Cy7 IgG1 de ratinho	BD Bioscience	348798

Caracterização imunofenotípica de células NK placentárias e células NK de sangue periférico (PB). As células NK podem ser divididas em dois grupos principais: células NK CD56⁺CD16⁺, e células CD56⁺CD16⁻. As células NK CD56⁺CD16⁺ têm grânulos citolíticos abundantes e expressão elevada de CD16, e são por isso capazes de induzir citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC). As células NK CD56⁺CD16⁻, pelo contrário, possuem muito poucos grânulos citolíticos, expressão baixa ou nenhuma expressão de CD16, mas são capazes de produzir citocinas e quimioquinas após activação. Células

NK individuais exibem um repertório de receptores activantes e inibidores, incluindo os receptores do tipo imunoglobulina assassina (KIRs, e.g., KIR3DL1 e KIR2DL2/3), receptores citotoxicidade natural NCRs (e.g., NKp30, NKp44 e NKp46), receptores do tipo lecitina de células assassinas (KLRs; e.g., CD94, NKG2D), 2B4 e CD226.

Realizou-se a análise FACS em células NK placentárias e células NK de sangue periférico utilizando mAbs conjugados com fluorescência contra receptores de NK específicos. Entre os 11 subconjuntos NK caracterizados, os números de células em sete dos 11 subconjuntos NK (CD3⁻CD56⁺CD16⁻, CD3⁻CD56⁺CD16⁺, CD3⁻CD56⁺KIR2DL2/3⁺, CD3⁻CD56⁺T1Kp46⁺, CD3⁻CD56⁺NKp30⁺, CD3⁻CD56⁺2B4⁺ e CD3⁻CD56⁺CD94⁺) mostraram diferença significativa ($p < 0,05$) entre células NK placentárias e células NK de sangue periférico (responsáveis por 64% da diferença) (Tabela 3A; ver também Tabelas 3B e 3C).

Tabela 3A. Caracterização fenotípica de células NK CD3⁻CD56⁺ em 16 unidades de sangue do cordão umbilical e perfusato placentário humano combinadas (combo) correspondentes de um dador e 13 unidades de sangue periférico (PB). Utiliza-se o teste t de duas amostras para determinar se as médias da população são iguais em unidades placentárias e de sangue periférico.

	Combo (16 unidades)	PB (13 unidades)	
Marcadores de superfície	Média %	Média %	Valor P
CD3 ⁻ CD56 ⁺	2,2	2,4	0,728
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁻	60,9	21,4	0,000
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺	39,1	78,6	0,000
CD3 ⁻ CD56 ⁺ KIR3DL1	12,3	7,1	0,099
CD3 ⁻ CD56 ⁺ KIR2DL2/L3	21,9	9,5	0,004
CD3 ⁻ CD56 ⁺ NKG2D	42,1	29,9	0,126
CD3 ⁻ CD66 ⁺ NKp46	7,0	18,9	0,011
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD226	16,0	26,7	0,135
CD3 ⁻ CD56 ⁺ NKp44	9,5	4,9	0,073

	Combo (16 unidades)	PB (13 unidades)	
Marcadores de superfície	Média %	Média %	Valor P
CD3-CD56+NKp30	39,1	19,0	0,006
CD3-CD56+284	11,1	4,5	0,019
CD3-CD56+CD94	71,3	26,2	0,000

As Tabelas 3B e 3C mostram a caracterização fenotípica de células NK CD3-CD56+CD16⁻ e CD3-CD56+CD16⁺ em 16 unidades de sangue do cordão umbilical e perfusato placentário humano combinadas (combo) correspondentes de um dador e 13 unidades de sangue periférico (PB) numa experiência separada.

Tabela 3B.

	Combo	PB	
Marcadores de Superfície	Média %	Média %	Valor P
CD3-CD56+CD16 ⁻	62,3	14,1	0,000
CD3-CD56+CD16-KIR3DL1	7,8	1,5	0,004
CD3-CD56+CD16-NKG2D	43,5	42,7	0,941
CD3-CD56+CD16-KIR2DL2/L3	13,6	2,4	0,000
CD3-CD56+CD16-NKp46	6,7	43,6	0,001
CD3-CD56+CD16-CD94	69,8	48,5	0,057
CD3-CD56+CD16-CD226	7,6	4,9	0,068
CD3-CD56+CD16-NKp44	3,4	0,6	0,076
CD3-CD56+CD16-NKp30	46,7	22,0	0,000
CD3-CD56+CD16-2B4	3,7	0,5	0,078

Tabela 3C.

	Combo	PB	
Marcadores de superfície	Média %	Média %	Valor P
CD3-CD56+CD16 ⁺	37,7	85,9	0,000
CD3-CD56+CD16+KIR3DL1	21,5	8,9	0,014
CD3-CD56+CD16+NKG2D	42,1	28,5	0,066

	Combo	PB	
Marcadores de superfície	Média %	Média %	Valor P
CD3-CD56+CD16+KIR2DL2/L3	34,5	12,1	0,000
CD3-CD56+CD16+NKp46	10,4	14,5	0,242
CD3-CD56+CD16+CD94	72,9	23,8	0,000
CD3-CD56+CD16+CD226	35,5	32,6	0,347
CD3-CD56+CD16+NKp44	22,6	6,4	0,016
CD3-CD56+CD16+NKp30	45,7	19,7	0,000
CD3-CD56+CD16+2B4	31,2	6,1	0,008

60,9% das células NK placentárias são CD56⁺CD16⁻ (células assassinas naturais intermédias derivadas de placenta (PINK)) enquanto apenas 21,4% das células NK de sangue periférico são CD56⁺CD16⁻. Após cultura durante 21 dias, a percentagem de quatro em 11 subconjuntos de NK (CD3⁻CD56⁺KIR2DL2/3⁺, CD3⁻CD56⁺NKp46⁺, CD3⁻CD56⁺NKp44⁺ e CD3⁻CD56⁺NKp30⁺) mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre células NK placentárias e de sangue periférico (Tabela 4).

Tabela 4. Caracterização fenotípica de células NK cultivadas até ao dia 21 obtidas a partir de 12 unidades de sangue do cordão umbilical e perfusato placentário humano combinadas (combo) correspondentes de um dador e 9 unidades de sangue periférico (PB). Utilizou-se o teste t de duas amostras para determinar se as médias da população são iguais em unidades combo e de sangue periférico.

	Combo (16 unidades)	PB (13 unidades)	
Marcadores de superfície	Média %	Média %	Valor P
CD3-CD56+	2,2	2,4	0,728
CD3-CD56+CD16-	60,9	21,4	0,000
CD3-CD56+CD16+	39,1	78,6	0,000
CD3-CD56+KIR3DL1	12,3	7,1	0,099
CD3-CD56+KIR2DL2/L3	21,9	9,5	0,004

	Combo (16 unidades)	PB (13 unidades)	
Marcadores de superfície	Média %	Média %	Valor P
CD3-CD56+NKG2D	42,1	29,9	0,126
CD3-CD56+NKp46	7,0	18,9	0,011
CD3-CD56+CD226	16,0	26,7	0,135
CD3-CD56+NKp44	9,5	4,9	0,073
CD3-CD56+NKp30	39,1	19,0	0,006
CD3-CD56+2B4	11,1	4,5	0,019
CD3-CD56+CD94	71,3	26,2	0,000

Adicionalmente, numa experiência separada, após cultura durante 21 dias, determinou-se que as células NK placentárias e de sangue periférico demonstraram perfis de citocina únicos, particularmente para IL-8, conforme determinado pelo ensaio Luminex (Tabela 5).

Tabela 5

Citoquina	PB (pg/mL)	Combo (pp/mL)
IL-13	1,26	1,89
IL-8	6,61	15,77
IL-10	1,26	2,23
TNF	0,28	0,34
MCP-1	10,49	11,32

Determinação do perfil de microARN de células NK placentárias e células NK de sangue periférico. Células NK isoladas ou expandidas foram submetidas a preparação de microARN (miARN) utilizando um *kit* de isolamento de miARN MIRVANA™ (Ambion, Cat# 1560). Quebraram-se as células NK (0,5 a $1,5 \times 10^6$ células) num tampão de lise desnaturante. A seguir, submeteram-se as amostras a extracção de ácido-fenol + clorofórmio para isolar ARN altamente enriquecido em relação a espécies de ARN pequeno. Adicionou-se etanol a 100% para ajustar as amostras a etanol a 25%. Quando se fez passar esta

mistura de lisado/etanol através de um filtro de fibra de vidro, imobilizaram-se os ARNs grandes, e colheram-se as espécies de ARN pequeno no filtrado. A concentração de etanol do filtrado foi então aumentada para 55%, e fez-se passar a mistura através de um segundo filtro de fibra de vidro onde os ARNs pequenos ficaram imobilizados. Lavou-se este ARN algumas vezes, e eluiu-se numa solução de força iónica baixa. Determinou-se a concentração e pureza do ARN pequeno recuperado por medição da sua absorvância a 260 e 280 nm.

Na Tabela 6 mostram-se os miARNs que se constatou serem únicos para células PINK. Constatou-se que um miARN, designado hsa-miR-199b, era único para células NK de sangue periférico.

Tabela 6. Determinação do perfil de miARN para células PINK e células NK de PB via qRT-PCR.

ID de miARN	N.º de Acesso Sanger	Sequência
hsa-miR-100	MIMAT0000098	aaccgguagauccgaacuugug
hsa-miR-127	MIMAT0000446	ucggauccgucugagcuuggcu
hsa-miR-211	MIMAT0000268	uuccuuugucauccuucgccu
hsa-miR-302c	MIMAT0000717	uaagugcuuccauguuucagugg
hsa-miR-326	MIMAT0000756	ccucuggggcccuuccuccag
hsa-miR-337	MIMAT0000754	uccagcuccuauaugaugccuuu
hsa-miR-497	MIMAT0002820	cagcagcacacugugguuugu
hsa-miR-512-3p	MIMAT0002823	aagugcugucauagcugagguc
hsa-miR-515-5p	MIMAT0002826	uucuccaaaagaaagcacuuucug
hsa-miR-517b	MIMAT0002857	ucgugcauccuuuagaguguu
hsa-miR-517c	MIMAT0002866	aucgugcauccuuuagagugu
hsa-miR-518a	MIMAT0002863	aaagcgcuucccuugcugga
hsa-miR-518e	MIMAT0002861	aaagcgcuucccuucagagug
hsa-miR-519d	MIMAT0002853	caaagugccuccuuuagagug
hsa-miR-520g	MIMAT0002858	acaagugcuucccuuagagugu
hsa-miR-520h	MIMAT0002867	acaagugcuucccuuagagu
hsa-miR-564	MIMAT0003228	aggcacggugucagcaggc

ID de miARN	N.º de Acesso Sanger	Sequência
hsa-miR-566	MIMAT0003230	gggcgccugugaucccaac
hsa-miR-618	MIMAT0003287	aaacucuacuuguccuucugagu
hsa-miR-99a	MIMAT0000097	aaccgguagauccgaucuugug

Caracterização imunofenotípica de células NK placentárias cultivadas e de células NK não cultivadas. Avaliaram-se as propriedades globais de células PINK cultivadas por estudos imunofenotípicos extensivos e ensaios de citotoxicidade. Para determinar o fenótipo de células NK expandidas, analisou-se a expressão de receptores NK (NKR) tais como KIRs, NKG2D, NKp46, NKp44 e 2B4. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados por marcação de células tumorais (células K562) com PKH26 e depois co-cultura com células PINK durante 4 horas. Desde o dia 0 até ao dia 21 a expressão de NKG2D foi aumentada de 60,9% ± 4,8% para 86% ± 17,4% (valor p de 0,024); a de NKp46 foi aumentada de 10,5% ± 5,4% para 82,8% ± 9,0% (valor p de 0,00002); a de NKp44 foi aumentada de 9,6% ± 6,5% para 51,6% ± 27,5% (valor p de 0,022); e a de 2B4 foi diminuída de 13,0% ± 7,1% para 0,65% ± 0,5% (valor p de 0,009%) (Tabela 7). Sob estas condições de cultura, os KIRs inibidores incluindo KIR3DL1 (receptor tipo imunoglobulina de célula assassina, três domínios, cauda citoplásmica longa 1, um receptor inibidor) e KIR2DL2/L3 (receptor tipo imunoglobulina de célula assassina, dois domínios, cauda citoplásmica longa 2 e cauda citoplásmica longa 3; receptores inibidores) permaneceram não afectados durante a expansão de 21 dias. As alterações na expressão de NKR foram ainda correlacionadas com um aumento acentuado na actividade citolítica ao dia 21 *versus* ao dia 14 contra células K562 (63% ± 15% *versus* 45% ± 4%, valor p de 0,0004). Estas constatações conduziram à identificação dos marcadores putativos de células NK que se correlacionam bem com a actividade de citotoxicidade de célula NK.

Tabela 7. Caracterização fenotípica de células PINK antes e após cultura de 21 dias. O desvio padrão (Stdev) foi calculado para médias da população para 5 dados.

	Dia 0		Dia 21	
	Média %	Stdev	Média %	Stdev
CD3-CD56+	2,9	1,1	85,5	8,6
CD3-CD56+CD16-	62,6	20,2	27,8	8,3
CD3-CD56+CD16+	37,4	20,2	72,2	8,3
CD3-CD56+KIR3DL1+	22,7	4,2	20,0	16,7
CD3-CD56+KIR2DL2/L3+	28,4	4,2	29,6	6,4
CD3-CD56+NKG2D+	60,9	4,8	86,0	17,4
CD3-CD56+NKp46+	10,5	5,4	82,8	8,9
CD3-CD56+CD226+	19,5	7,4	14,1	13,3
CD3-CD56+NKp44+	9,6	6,5	51,6	27,5
CD3-CD56+NKp30+	58,9	7,0	76,5	19,4
CD3-CD56+2B4+	13,0	7,1	0,6	0,5
CD3-CD56+CD94+	79,7	4,9	63,9	19,4

Determinação do perfil da membrana proteómica de células NK placentárias cultivadas e de células NK de sangue periférico cultivadas através de tecnologia de imobilização de proteína baseada em lípido e LC/MS de armadilha de iões linear.

Purificação de proteína de membrana: Células assassinas naturais placentárias a partir de células de perfusato placentário e de sangue de cordão umbilical combinadas, e células NK de PB, cultivadas durante 21 dias, foram incubadas durante 15 min com uma solução de cocktail de inibidor de protease (P8340, Sigma Aldrich, St. Louis, MO; contém fluoreto de 4-(2-aminoetil)benzenossulfonilo (AEBSF), pepstatina A, E-64, bestatina, leupeptina e aprotinina, sem queladores de metal) antes da lise celular. As células foram depois lisadas pela adição de uma solução de HCl 10 mM, sem detergentes, e centrifugadas durante 10 min a 400xg para sedimentar e remover os núcleos. Transferiu-se o sobrenadante pós-nuclear para um tubo de ultracentrifugação e centrifugou-se numa ultracentrifugadora WX80 com rotor T-1270 rotor (Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC) a 100000xg durante 150 minutos gerando um sedimento de proteína de membrana.

Geração, imobilização e digestão de proteolipossomas: O sedimento de proteína de membrana foi lavado várias vezes utilizando tampão NANOXIS® (Tris 10 mM, NaCl 300 mM, pH 8). Suspendeu-se o sedimento de proteína de membrana em 1,5 mL de tampão NANOXIS® e depois tratou-se com uma ponta de ultra-sons utilizando um processador ultra-sónico VIBRA-CELL™ VC505 (Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT) durante 20 minutos em gelo. O tamanho dos proteolipossomas foi determinado por coloração com pigmento FM1-43 (Invitrogen, Carlsbad, CA) e visualização com microscopia de fluorescência. A concentração de proteína da suspensão de proteolipossomas foi determinada por um ensaio BCA (Thermo Scientific). Injectaram-se depois os proteolipossomas num LPI™ Flow Cell (Nanoxis AB, Gotemburgo, Suécia) utilizando uma ponta de pipeta padrão e deixaram-se imobilizar durante 1 hora. Após imobilização, realizou-se uma série de passos de lavagem e injectou-se tripsina a 5 µg/mL (Princeton Separations, Adelphi, NJ) directamente no LPI™ Flow Cell. Incubou-se o *chip* de um dia para o outro a 37°C. Os péptidos tripsinizados foram depois eluídos a partir do *chip* e depois dessalinizou-se utilizando um cartucho Sep-Pak (Waters Corporation, Milford, MA).

Fracção por permuta catiónica forte (SCX, *Strong Cation-Exchange*): Reconstituíram-se os péptidos tripsinizados numa solução de ácido fórmico a 0,1%/água e carregou-se numa coluna de permuta catiónica forte (SCX) TOP-TIP™ (PolyLC, Columbia, MD), uma ponta de pipeta empacotada com material de enchimento de SCX polysufoETHYL aspartamida 30 µm. Eluíram-se os péptidos a partir da SCX TOP-TIP™ utilizando um gradiente em degraus de tampão de formato de amónio, pH 2,8 (10 mM-500 mM). Cada fracção de SCX foi seca utilizando um sistema speed-vac e reconstituída com acetonitrilo a 5%, ácido fórmico a 0,1% na preparação para a análise LC/MS a jusante.

Análise LC/MS/MS de armadilha de iões linear LTQ: Cada fracção SCX foi separada numa coluna C18 MAGIC 3 µm 200 Å 0,2 mm x 150 mm y (Michrom Bioresources, Inc., Auburn, CA) interligada directamente a uma fonte de ionização de *electrospray* de nanocapilar assistida por vácuo de dessolvatação axial (ADVANCE) (Michrom Bioresources, Inc.) utilizando um gradiente de 180 min (Tampão A: água, ácido fórmico a 0,1%; Tampão B: acetonitrilo, ácido fórmico a 0,1%).

A fonte ADVANCE consegue uma sensibilidade que é comparável à da nanoESI tradicional operando a um caudal consideravelmente mais elevado de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. Os péptidos eluídos num espectrómetro de massa de armadilha de iões linear LTQ (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) que utilizou dez varrimentos de MS/MS dependentes de dados após cada espectro de massa de varrimento completo.

Bioinformática: Seis ficheiros RAW correspondentes às 6 fracções salinas que foram colhidas para cada linha de células tumorais (AML, CML) foram pesquisados como uma pesquisa única contra a IPI Human Database utilizando uma implementação do algoritmo SEQUEST numa estação de trabalho SORCERER™ SOLO™ (Sage-N Research, San Jose, CA). Especificou-se uma tolerância de massa de péptido de 1,2 amu, especificou-se a oxidação de metionina como uma modificação diferencial e especificou-se a carbamidometilação como uma modificação estática. Utilizou-se uma implementação do software Scaffold da Trans-Proteomic Pipeline (TPP) para classificar e analisar os dados da membrana proteómica. As proteínas foram consideradas para análise se fossem identificadas com uma probabilidade de péptido de 95%, probabilidade de proteína de 95% e 1 péptido único. Efectuaram-se comparações entre conjuntos de dados da membrana proteómica utilizando scripts Perl adaptados que foram desenvolvidos internamente.

A análise revelou a identificação de 8 proteínas de membrana a partir de células NK placentárias cultivadas que eram únicas no que se refere às proteínas de membrana identificadas a partir de células NK de sangue periférico. Ver Tabela 8. Adicionalmente, identificaram-se 8 proteínas de membrana a partir de células NK de sangue periférico que eram únicas no que se refere às células NK placentárias. Ver Tabela 8. Constatou-se que apenas 10 proteínas de membrana identificadas eram partilhadas entre as células NK placentárias cultivadas e as células NK de sangue periférico.

Tabela 8.

PROTEÍNAS ESPECÍFICAS PARA CÉLULAS NK PLACENTÁRIAS	PROTEÍNAS ESPECÍFICAS PARA CÉLULAS NK DE PB
Aminopectidase N	Precursor de receptor 4 de factor de crescimento fibroblástico
Apolipoproteína E	Proteína 1 semelhante a nucleótico 4 associado a imunidade
Proteína de interacção 1 de atrofina-1	Precursor de integrina alfa-L
Inexina inx-3	Precursor de integrina beta-2
Precursor de integrina alfa- 2	Precursor de integrina beta-4
Precursor de integrina beta- 5	Precursor de transglicosilase lítica D de mureína ligado a membrana
Precursor de glicoproteína GP49B de superfície de mastócitos	Proteína 8 relacionada com proteína de ligação de oxiesterol
Receptor 1 de rianodina	Precursor de perforina 1

6.3. Exemplo 3: Citotoxicidade de células assassinas naturais em relação a células tumorais

Este exemplo demonstra que células assassinas naturais intermédias placentárias são citotóxicas em relação a células tumorais. Células PINK a partir de HPP são citotóxicas para células de leucemia mielógena aguda, como demonstrado num ensaio de citotoxicidade e por análise Luminex da secreção de citocina de célula NK.

No ensaio de secreção de citocina, células NK a partir de HPP enriquecidas por micropérolas de CD56 foram misturadas com células de leucemia mielógena aguda KG-1a numa proporção 1:1. Após incubação durante 24 horas, colheu-se o sobrenadante e submeteu-se a análise Luminex da secreção de IFN- γ e GM-CSF. Observaram-se níveis acrescidos de IFN- γ e GM-CSF após 24 h de

incubação de células de HPP enriquecidas em CD56 com células KG-1a como se mostra na FIG. 2.

Citotoxicidade de células PINK

Num ensaio de citotoxicidade utilizando células PINK, células tumorais alvo foram marcadas com éster de succinimidilo de carboxifluoresceína (CFSE). O CFSE é um corante vital que é não tóxico para as células, e é repartido entre as células filhas durante a divisão celular. Colocaram-se depois as células em placas de cultura de tecido de 96 poços de fundo em U e incubaram-se com células PINK CD56⁺CD16⁻ isoladas de fresco com proporções efector-alvo (E:T, *effector-target*) de 20:1, 10:1, 5:1 e 1:1 em RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS. Após um tempo de incubação de 4 horas, colheram-se as células e examinaram-se por citometria de fluxo quanto à presença de CFSE. Como referência utilizou-se o número de células alvo recuperadas a partir da cultura sem células NK. A citotoxicidade é definida como: $(1 - \text{CFSE}_{\text{amostra}} / \text{CFSE}_{\text{controlo}}) * 100\%$. Observou-se uma citotoxicidade significativa para as células de tumor com a proporção 20:1. Ver FIG. 3.

Susceptibilidade de células tumorais a células PINK cultivadas. Ensaio de libertação de lactato-desidrogenase (LDH). O ensaio de libertação de LDH foi realizado utilizando o kit de ensaio de citotoxicidade colorimétrico CYTOTOX 96® (Promega, Cat# G1780). Neste ensaio, células NK cultivadas, compreendendo uma combinação de células CD56⁺CD16⁻ e células CD56⁺CD16⁺ obtidas a partir de HPP/UCB correspondentes, eram as células efectoras e as células tumorais eram as células alvo. Colocaram-se as células efectoras e as células alvo em placas de cultura de tecido de 96 poços de fundo em U e incubaram-se para várias proporções de efector-alvo (E:T) em 100 µl de RPMI 1640 sem vermelho de fenol (Invitrogen, Cat# 11835-030) suplementadas com soro AB humano a 2% (Gemini, Cat# 100-512). Incubaram-se as culturas durante 4 h a 37°C em 5% de CO₂. Após incubação, transferiram-se 50 µl de sobrenadante para a placa de ensaio enzimático, detectou-se a actividade de LDH como proporcionado pelo fabricante e mediu-se a absorção a 490 nm num leitor ELISA (Synergy HT, Biotek). O grau de citotoxicidade foi calculado de acordo com a equação seguinte:

Citotoxicidade em % = (Amostra - Efeitor Espontânea - Alvo Espontânea)/(Alvo Máxima - Alvo Espontânea)*100.

Certos tipos de tumor podem ser mais responsivos a células NK do que outros. Para analisar a susceptibilidade de células tumorais a células PINK cultivadas, analisaram-se doze linhas de células tumorais diferentes, co-cultivadas com células PINK, num ensaio de libertação de LDH. As 12 linhas de células tumorais incluíram leucemia mielógena crónica (CML) humana, linfoma, retinoblastoma (RB) e mieloma múltiplo (MM) (Tabela 9). Mediu-se a citotoxicidade de células NK pelo ensaio de libertação de LDH após co-cultura de 4 horas.

Tabela 9. Linhas de células tumorais ATCC

Nome	Descrição
CCRF-CEM	Leucemia de humano
KG-1	Leucemia mielóide aguda de humano
KG-1A	Leucemia mielóide aguda de humano
K562	Leucemia mielóide crónica de humano
KU812	Leucemia mielóide crónica de humano
U-937	Linfoma histiocítico de humano
WERI-RB-1	Retinoblastoma de humano
HCC2218	Cancro da mama de humano
RPMI 8226	Mieloma múltiplo de humano
HCT116	Carcinoma colo-rectal de humano
HT29	Adenocarcinoma colo-rectal de humano
U266	Mieloma múltiplo de humano

Numa proporção de efector para alvo (E:T) de 10:1 observou-se uma citotoxicidade significativa de células PINK cultivadas em relação a células K562 (CML) a 88,6% ± 5,6%, células U937 (linfoma) a 89,2% ± 9,8%, células WERI-RB-1 (RB) a 73,3% ± 11,8%, células RPMI8226 (MM) a 61,3% ± 1,3% e células U266 (MM) a 57,4% ± 4,7% (Tabela 10).

Tabela 10. Susceptibilidade diferencial de células tumorais a células PINK cultivadas. O erro padrão da média (S.E.M.) foi calculado para a citotoxicidade média a partir de 3 dados.

Linha de células	Citotoxicidade em %	S.E.M.
CCRF-CEM	7,6	1,2
KG-1	20,5	1,5
KG-1 ^a	6,0	3,2
K562	88,6	5,6
KU812	40,3	8,2
U937	89,2	9,8
WERI-RB-1	73,3	11,8
RPMI8226	61,3	1,3
U266	57,4	4,7
HCT-116	61,0	5,1
HCC2218	14,8	3,7
HT-29	45,6	6,0

Intensificação da citotoxicidade de células PINK por tratamento com lenalidomida e pomalidomida

Isolamento e purificação de ARN. Células NK expandidas ou isoladas foram submetidas a preparação de ARN utilizando o kit RNAQUEOUS®-4PCR (Ambion, Cat #AM1914). Resumidamente, células NK (0,5 a 1,5 x 10⁶ células) foram lisadas na solução de lise de guanidínio. Depois misturou-se o lisado de amostra com uma solução de etanol, e aplicou-se a um filtro à base de sílica que se liga selectivamente e quantitativamente a ARNm e aos ARNs ribossómicos maiores; ARNs muito pequenos tais como ARNt e ARN ribossómico 5S não foram ligados quantitativamente. Lavou-se depois o filtro para remover ADN residual, proteína e outros contaminantes, e eluiu-se o ARN em água isenta de nuclease contendo uma quantidade vestigiária de EDTA para quelar metais pesados. O filtro de sílica estava alojado num pequeno cartucho que se ajusta dentro dos tubos de microcentrifugadora isentos de RNase fornecidos com o *kit*. O lisado de amostra, soluções de lavagem e solução de eluição foram transportados através do filtro por centrifugação ou

pressão de vácuo. Após eluição a partir do filtro, tratou-se o ARN com a DNase 1 ultrapura fornecida com o *kit* para remover quantidades vestigiárias de ADN. Finalmente, removeram-se a DNase e os catiões divalentes com um reagente também fornecido com o *kit*. Determinaram-se a concentração e a pureza do ARN recuperado por medição da sua absorvância a 260 e 280 nm.

Análise quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Pode-se utilizar depois o ARN isolado para síntese de ADNc utilizando reagentes de transcrição reversa TAQMAN® (Applied Biosystems, Cat #N8080234) seguindo-se análise de PCR em tempo real pelo sistema de PCR em tempo real 7900HT Fast utilizando um imunoarranjo de humano (Applied Biosystems, Cat# 4370573) e um arranjo de microARN de humano (Applied Biosystems, Cat# 4384792).

Lenalidomida e pomalidomida são análogos químicos de talidomida com actividades anti-inflamatória e anticancro melhoradas. Para estudar se lenalidomida e pomalidomida podiam intensificar a citotoxicidade de células PINK, células PINK cultivadas *ex vivo* (dia 19) foram pré-tratadas com lenalidomida ou pomalidomida durante 24 horas seguindo-se co-cultura com a linha de células alvo de carcinoma colo-rectal HCT-116. As células NK tratadas com lenalidomida demonstraram uma citotoxicidade de 42,1% e as células NK tratadas com pomalidomida mostraram uma citotoxicidade de 47,4%, enquanto células PINK não tratadas de controlo mostraram apenas uma citotoxicidade de 24,3%.

As análises de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) e citometria de fluxo mostraram que a intensificação da citotoxicidade de células NK induzida por pomalidomida estava correlacionada com a expressão aumentada do gene de granzima B (GZMB) (aumento de $60\% \pm 1,7\%$) (Tabela 11) e uma percentagem aumentada de células NK GZMB positivas (aumento de 25%). Adicionalmente, a expressão de GM-CSF estava aumentada em células PINK tratadas com lenalidomida (aumento de $232\% \pm 1,6\%$) e pomalidomida (aumento de $396\% \pm 0,3\%$) (Tabela 11A, 11B).

Tabela 11A, 11B. Análise de qRT-PCR de células PINK cultivadas tratadas com lenalidomida e pomalidomida em comparação com células não tratadas. 11A: Vezes de modificação da expressão

génica entre amostras tratadas com lenalidomida e não tratadas com lenalidomida para os genes listados. Utiliza-se o teste t emparelhado para determinar se as vezes de alteração são iguais em amostras tratadas e não tratadas com lenalidomida. 11B: Vezes de modificação da expressão génica entre amostras tratadas com pomalidomida e não tratadas com pomalidomida para 25 genes listados. Utiliza-se o teste t emparelhado para determinar se as vezes de alteração são iguais em amostras tratadas e não tratadas.

Table 11A

	Veh	Len.	Veh-stdev	Len.-stdev	Valor P
BAX	1	1,39	0,06	0,02	0,05
CCL5	1	1,24	0,11	0,07	0,04
CCR5	1	0,9	0,07	0,08	0,02
CD68	1	4,04	0,05	0,13	0,01
CD8A	1	1,3	0,01	0,02	0,02
CSF2	1	2,32	0,14	0,02	0,02
FAS	1	1,11	0,02	0,04	0,04
GUSB	1	1,13	0,04	0,07	0,05
IL2RA	1	1,26	0,03	0,01	0,03
TNFRSF18	1	0,7	0,1	0,16	0,04

BAX - Proteína X associada a BCL2

CCL5 - ligando 5 de quimioquina (motivo C-C)

CCR5 - receptor 5 de quimioquina (motivo C-C)

CSF2 - factor 2 estimulante de colónias (granulócito-macrófago)

FAS - Superfamília de receptores de TNF, membro 6

GUSB - glucuronidase-

IL2RA - Receptor 2 de interleucina

TNFRSF18 - Superfamília de receptores de factor de necrose de tumor, membro 18

Table 11B

	Veh	Pom.	Veh-stdev	Pom.-stdev	Valor P
ACTB	1	0,77	0,01	0	0,01
BAX	1	2,23	0,06	0	0,01
CCL2	1	5,46	0,01	0,37	0,02
CCL3	1	2,2	0,04	0,16	0,02
CCL5	1	1,78	0,11	0,04	0,02
CCR5	1	0,68	0,07	0	0,05
CD68	1	8,74	0,05	0,19	0
CD80	1	1,59	0,13	0,19	0,02
CD8A	1	2,39	0,01	0,08	0,01
CSF1	1	1,41	0,07	0,05	0,01
CSF2	1	3,96	0,14	0	0,01
ECE1	1	1,56	0,06	0,12	0,02
FAS	1	1,34	0,02	0,03	0,01
GNLY	1,01	1,96	0,18	0,02	0,05
GUSB	1	1,76	0,04	0,01	0,01
GZMB	1	1,59	0,06	0,02	0,03
IL10	1,02	1,52	0,31	0,22	0,04
IL1A	1,01	2,61	0,19	0,12	0,01
IL2RA	1	1,58	0,03	0,06	0,01
IL8	1	1,62	0,04	0,06	0,04
LTA	1	2,88	0,02	0,21	0,02
PRF1	1	1,17	0,07	0,1	0,05
PTGS2	1	1,68	0,01	0,05	0,02
SKI	1	1,96	0,04	0,02	0,01
TBX21	1,01	2,05	0,14	0,2	0,01
ACTB - -actina					
BAX - Proteína X asociada a BCL2					
CCL2 - ligando 2 de quimioquina (motivo C-C)					
CCL3 - ligando 3 de quimioquina (motivo C-C)					
CCL5 - ligando 5 de quimioquina (motivo C-C)					

CCR5 - receptor 5 de quimioquina (motivo C-C)
CSF1 - factor 1 estimulante de colónias (macrófago)
CSF2 - factor 2 estimulante de colónias (granulócito-macrófago)
ECE1 - Enzima 1 de conversão de endotelina
FAS - Superfamília de receptores de TNF, membro 6
GNLY - granulicina
GUSB - glucuronidase-
GZMB - granzima B (granzima 2, serina-esterase 1 associada a linfócito T citotóxico)
IL1A - interleucina 1
IL2RA - receptor de interleucina 2
IL8 - interleucina 8
IL10 - interleucina 10
LTA - linfoxina (superfamília de TNF, membro 1)
PRF1 - perforina 1 (proteína formadora de poro)
PTGS2 - prostaglandina-endoperóxido sintase 2 (prostaglandina G/H sintase e ciclo-oxigenase)
SKI - homólogo de oncogene viral de sarcoma v-ski (aviário)
TBX21 - T-box 21

Citotoxicidade de células assassinas naturais combinadas

Num ensaio de citotoxicidade em separado, células NK separadas obtidas a partir de sangue do cordão umbilical e perfusato placentário correspondentes de um dador foram células efectoras, enquanto as células tumorais eram células alvo. Marcaram-se as células tumorais com PKH26 (Sigma-Aldrich Catálogo # PKH26-GL) (ver, e.g., Lee-MacAry *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 252(1-2):83-92 (2001)), que se insere na membrana plasmática da célula devido ao seu resíduo alifático lipofílico, depois colocaram-se em placas de cultura de tecido de 96 poços de fundo em U e incubaram-se com células NK cultivadas para várias proporções de efector-alvo (E:T) em 200 μ l DE RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS. Incubaram-se as culturas durante 4 h a 37°C em CO₂ a 5%. Após incubação, colheram-se as células e adicionou-se às culturas TO-PRO-3 (Invitrogen, Catálogo # T3605), um corante de ADN não permeável na membrana, até uma concentração final de 1 μ M seguindo-se a análise FACS utilizando BD FACSCanto. A citotoxicidade foi expressa como a percentagem de células mortas (PKH26⁺TO-PRO-3⁺) no total de células tumorais alvo PKH26⁺.

Neste ensaio de citotoxicidade, células K562 de linfoma mielóide crónico (CML) de humano foram marcadas com PKH26, que se insere na membrana plasmática da célula, e colocaram-se em placas de cultura de tecidos de 96 poços de fundo em U. Células NK placentárias (combo) ou de sangue periférico cultivadas durante 21 dias foram misturadas com células K562 com proporções de efector para alvo (E:T) de 10:1, 5:1, 2,5:1 e 1,25:1 em RPMI 1640 suplementado com FBS a 10% v/v. Após um tempo de incubação de 4 horas, colheram-se as células e adicionou-se TO-PRO-3 às culturas de células seguindo-se citometria de fluxo quanto à presença de PKH26 e TO-PRO-3. A citotoxicidade foi expressa como a percentagem de células mortas PKH26⁺TO-PRO-3⁺ no total de células tumorais alvo PKH26⁺. Tanto as células NK placentárias como as células NK de sangue periférico mostraram toxicidade substancial em relação a células K562 para todas as proporções E:T testadas (FIG. 4). Observou-se uma toxicidade significativamente mais elevada de células NK placentárias do que células NK de sangue periférico em relação a células K562 para duas proporções de E:T, 10:1 e 5:1 (FIG. 4).

6.4. Exemplo 4: Citotoxicidade de perfusato placentário humano em relação a células tumorais

Este Exemplo demonstra que células de perfusato placentário humanas são citotóxicas para células tumorais, e que a citotoxicidade de células nucleadas totais a partir de HPP (TNC-HPP) sobre KG-1a foi mais elevada do que a de TNC a partir de UCB correspondente. Células nucleadas totais a partir de HPP ou de sangue do cordão umbilical (UCB) foram misturadas com células KG-1a em proporções de 1:1, 5:1, 10:1, 20:1 ou 100:1. Após incubação de 24 h ou 48 h, colheram-se as células e examinaram-se quanto à presença de CFSE por análise FACS (BD FACSCanto, BD Bioscience). Como controlos, utilizaram-se células tumorais cultivadas sozinhas. A citotoxicidade foi definida como: $(1 - CFSE_{amostra} / CFSE_{controlo}) * 100\%$. Observou-se uma citotoxicidade significativa para a proporção 100:1. Ver FIG. 5.

Numa experiência separada, comparou-se a citotoxicidade de células nucleadas totais a partir de HPP com a de células

nucleadas totais a partir de sangue do cordão umbilical. Misturaram-se TNC de HPP ou UCB correspondentes com células KG-1a com proporções de 0,78:1, 1,56:1, 3,12:1, 6,25:1, 12,5:1, 25:1, 50:1 ou 100:1. As TNC de HPP mostraram citotoxicidade consistentemente mais elevada para todas as proporções em comparação com as de UCB. Ver FIG. 6.

Noutra experiência, 24 horas antes da incubação com células KG-1a, estimularam-se as TNC de HPP com 100U/mL ou 1000U/mL de IL-2, enquanto HPP cultivado com meio RPMI foi utilizado como controlo. Numa proporção de 6,25 células NK por células de KG-1a e superior, a IL-2 parece aumentar a citotoxicidade das TNC de HPP. Ver FIG. 7.

Repetiram-se as experiências utilizando um conjunto mais vasto de tipos de células tumorais, como se mostra na Tabela 12, utilizando 5×10^5 células de HPP e 1×10^4 células tumorais.

Tabela 12: Tipos de células tumorais testadas quanto ao efeito citotóxico de perfusato placentário

HCC2218	Carcinoma ductal primário de humano
CCRF-CEM	Leucemia de humano
J.RT3-T3.5	Leucemia de células T aguda de humano
K562	Linfoma mielóide crónico (CML) de humano
KG-1	Leucemia mielógena aguda de humano
KG-1a	Leucemia mielógena aguda de humano (AML)
KU812	Leucemia de humano (CML)
NCl-H1417	Carcinoma de pulmão de humano
SNU-C1	Adenocarcinoma do cólon de humano
U-937	Linfoma histiocítico de humano
WERI-RB-1	Retinoblastoma de humano
HCT-116	Carcinoma colo-rectal de humano
HT-29	Adenocarcinoma colo-rectal de humano
U266	Mieloma de humano

Quando células de HPP e células tumorais foram co-cultivadas durante 24 horas ou 48 horas numa proporção de 50:1, as células de HPP mostraram toxicidade substancial em relação às células tumorais. Para ambos os tempos, a co-cultura resultou na morte de mais de 50% das células tumorais. Ver FIGS. 8A e 8B.

6.5. Exemplo 5: Produção de citocina por células de perfusato placentário humanas durante a exposição a células tumorais

Para determinar o mecanismo de acção primário responsável pela mediação dos potentes efeitos anti-leucémicos de células de HPP, analisou-se o perfil de libertação de citocina de células de HPP co-cultivadas com linhas de células tumorais, e em comparação com o de células de UCB, para momentos temporais diferentes pelo ensaio Luminex multiplexado.

Sobrenadantes colhidos pós-incubação foram submetidos ao ensaio Luminex para determinar as concentrações de IFN- γ , TNF- α e GM-CSF (Cat# HCYTO-60K-03, Millipore). Estas três citocinas estão relacionadas com a citotoxicidade NK. (Ver, e.g., Imai *et al.*, *Blood* 2005. 106(1):376-83.). Realizou-se também RT-PCR quantitativa para examinar a expressão de IFN- γ , TNF- α e GM-CSF utilizando o equipamento e iniciadores FAST 7900HT da Applied Biosystems. As condições de cultura foram as mesmas que para os ensaios de citotoxicidade co-cultura descritos acima. As concentrações de citocinas foram determinadas utilizando um ensaio Luminex.

Determinou-se que a secreção de IFN- γ , TNF- α e GM-CSF a partir de células de HPP co-cultivadas com células tumorais era significativamente mais elevada do que a de células de UCB. Numa experiência, misturaram-se células de HPP com células KG-1a nas proporções de 0,78:1, 1,56:1, 3,12:1, 6,25:1, 12,5:1, 25:1, 50:1 ou 100:1, na presença ou ausência de 100 U de IL-2. As TNC de HPP exibiram produção consistentemente aumentada de IFN- γ na presença de IL-2 em comparação com a ausência de IL-2. Determinou-se que os níveis de IFN- γ às 24 h aumentaram cerca de 5-26 vezes (mediana: 16 vezes); às 48 h à volta de 3-65 vezes (mediana: 27 vezes), o que era consistente com os resultados a partir do estudo de citotoxicidade. Ver FIG. 9.

Noutra experiência, 24 horas antes da incubação com células KG-1a, estimularam-se as TNC de HPP com 100 U/mL, ou 1000 U/mL de IL-2, enquanto como controlo de utilizou HPP cultivado com meio RPMI. Células de HPP ou de UCB correspondentes foram incubadas 24 h com ou sem IL-2, antes da co-cultura com células KG-1a. A secreção de IFN- γ estava muito aumentada em células de HPP co-cultivadas com K562 e KG-1a às 48 h. Quando se trataram células de HPP com 100 U/mL de IL-2, aumentou-se a citotoxicidade de células de HPP sobre KG-1a às 24 h e às 48 h. O nível de secreção de IFN- γ em células de HPP era mais elevado do que o das células de UCB correspondentes após tratamento de IL-2. A expressão mais elevada de IFN- γ foi confirmada por análise de RT-PCR de células a partir de HPP e UCB correspondentes. Estes resultados mostram que células de HPP exibem actividade anti-leucémica mais elevada em comparação com células de UCB e esta actividade mais elevada está associada a um aumento significativo na produção de IFN- γ .

Analisou-se a produção de IFN- γ em células de HPP, e em células de sangue do cordão umbilical, durante a co-cultura com um painel de linhas de células tumorais utilizando as linhas de células tumorais listadas na Tabela 1, acima. Células de HPP e células tumorais foram co-cultivadas durante 24 horas ou 48 horas numa proporção de 50:1, utilizando 10^4 células tumorais e 5×10^5 células de HPP. Para as linhas de células CCRF-CEM, J.RT3-T3.5, K562, KG1, KG-1a, KU812, NC1-H1417, U-937 e WER1-RB-1, o aumento na produção de IFN- γ nas células de HPP na co-cultura durante 24 horas excedeu o das células de sangue do cordão umbilical co-cultivadas com estas linhas de células para o mesmo tempo. Ver FIG. 10A. Às 48 horas de co-cultura, o aumento na produção de IFN- γ em células de HPP excedeu o de células de sangue do cordão umbilical para todas as linhas de células tumorais. Ver FIG. 10B. Das linhas de células tumorais, as células K562 induziram o maior aumento na produção de IFN- γ em células de HPP tanto às 24 horas como às 48 horas. Observaram-se resultados similares para TNF- α e GM-CSF.

A análise do ciclo celular demonstrou que a percentagem de KG-1a na fase S diminuiu 30% quando co-cultivadas com HPP em comparação com células KG-1a cultivadas sozinhas.

Adicionalmente, experiências de co-cultura realizadas utilizando diferentes fracções enriquecidas de HPP demonstraram que a actividade anti-leucémica de HPP era grandemente atribuída à elevada concentração de células assassinas naturais imaturas únicas caracterizadas por expressão de CD56⁺, com ausência de expressão de CD16.

6.6. Exemplo 6: Supressão da proliferação de células tumorais in vivo por células de perfusato placentário humanas

6.6.1. Materiais & Métodos

Este Exemplo demonstra a eficácia de perfusato placentário humano *in vivo* contra células tumorais utilizando um modelo de tumor de xenoenxerto de ratinho NOD/SCID.

Cultura de células KG-1. Mantiveram-se células KG-1 em meio de Dulbecco modificado por Iscove suplementado com 20% de soro fetal de bovino (meio de crescimento) a 37°C em 95% de air/5% de CO₂ e 100% de humidade. Mudou-se o meio de cultura dia sim, dia não e submeteram-se as células a passagem semanalmente. As células KG-1 cresceram como suspensões. Por conseguinte, por mudança do meio ou passagem das células, colheram-se as suspensões de células em tubos de centrifugadora e centrifugaram-se a 2 000 rpm durante 10 min num rotor SORVALL® HERAEUS® (peça n.º 75006434). Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se uma quantidade apropriada do sedimento celular no meio de crescimento para continuação da cultura.

Preparação de células KG-1 para implantação. Para implantação de células em ratinhos, colheram-se as células por centrifugação como descrito acima. Colheram-se os sedimentos celulares e ressuspenderam-se em solução salina tamponada com fosfato. Para determinar o número de células a serem implantadas nos ratinhos, contou-se uma alíquota da suspensão de células utilizando um hemocitómetro. Utilizou-se o corante Azul de Tripano para excluir as células não viáveis na suspensão.

Preparação de células de HPP para implantação. Para armazenamento e descongelação de HPP, receberam-se as amostras congeladas num recipiente de transporte seco em boas condições.

Armazenaram-se as unidades no recipiente de transporte seco até à descongelação em 7 de Fevereiro de 2007. No dia da descongelação, removeram-se as unidades de HPP do congelador de criopreservação (uma de cada vez) e colocaram-se em sacos de plástico zip-top. Colocaram-se depois os sacos num banho de água a 37°C com agitação suave até ficarem quase totalmente descongelados (uma pequena parte congelada permanecendo no saco). Removeram-se depois os sacos do banho de água, removeram-se as unidades dos sacos zip-top, e as unidades foram cuidadosamente invertidas até estarem completamente descongeladas. Colocaram-se depois as unidades numa câmara de fluxo laminar e esterilizou-se a superfície exterior do saco de sangue por pulverização com etanol a 70%. Abriram-se os sacos de sangue cortando-os com tesouras esterilizadas, e transferiram-se as células para tubos cónicos de 50 ml (1 tubo para cada unidade de HPP; 2 tubos para cada unidade de UCB) através de uma pipeta estéril. A seguir, adicionaram-se lentamente 10 mL de tampão de descongelação (2,5% de albumina humana, 5% de dextrano 40) a cada tubo com mistura suave (durante um período de 2,2 - 2,9 minutos). Lavou-se depois cada saco de sangue com 10 mL tampão de descongelação, que foram depois adicionados lentamente ao tubo cónico de 50 ml (durante um período de 0,7 - 1,3 min).

Após descongelação, armazenou-se cada unidade de sangue em gelo húmido antes da centrifugação. Centrifugaram-se todos os tubos durante 10 min (440 x g a 10°C), aspiraram-se os sobrenadantes utilizando pipetas estéreis, e quebraram-se gentilmente os sedimentos sacudindo o tubo. Adicionou-se uma alíquota de 1 ml de veículo (PBS + 1% de soro fetal de vitelo) a um dos tubos, e misturou-se o tubo por movimentos suaves. Utilizando uma pipeta de 2 ml, transferiram-se os conteúdos para um segundo tubo e depois para um terceiro tubo e depois para um quarto tubo. Lavaram-se os tubos esvaziados com 0,2 ml de tampão de diluição.

Para contagem das células, transferiu-se uma alíquota de 25 µl para um tubo cónico de 15 ml contendo 975 µl de veículo em gelo. Lisaram-se então os eritrócitos por adição de 4 ml de reagente de lise de cloreto de amónio frio e incubação em gelo durante 10 min. Após incubação, adicionaram-se 5 ml de PBS frio a cada tubo e centrifugaram-se os tubos (10 min, 400 x g,

10°C). Após lise de RBC, contaram-se as células por hemocitómetro, utilizando Azul de Tripano para avaliar a viabilidade. Os resultados da contagem foram corrigidos quanto à diluição e depois divididos por um factor de lise (0,46) para estimar o número de células presentes antes da lise de RBC.

Para preparação da dose de HPP, após contagem, diluíram-se as células de HPP até 1×10^8 células/ml por adição de veículo. As células de HPP foram depois armazenadas em gelo até se carregarem as seringas. O tempo decorrido entre a descongelação da primeira unidade e a conclusão da preparação das doses foi menos de 3 horas.

Antes do enchimento das seringas, colocou-se de lado uma alíquota de 50 μ l do material de dosagem para verificação por contagem como descrito acima. Após dosagem, o material de dose restante foi avaliado para verificação da dose.

Desenho do estudo. Ao Dia 1, em vinte e quatro ratinhos NOD/SCID machos (Jackson Laboratories) implantaram-se 5 milhões de células KG-1 viáveis S/C na região do flanco. Separaram-se os ratinhos tal que quatro a cinco ratinhos fossem alojados num sistema de gaiolas de micro-isolamento com um leito de aparas de madeira. Ração de roedor esterilizada e água foram fornecidos *ad libitum*. Os ratinhos foram monitorizados de perto duas vezes por semana quanto ao crescimento do tumor. O primeiro tumor mensurável foi observado ao Dia 25. Registaram-se depois os pesos corporais uma vez por semana e registaram-se as medições dos tumores duas vezes por semana com um paquímetro. Ao Dia 52 pós-implantação, os animais foram randomizados em três grupos separados, com volumes de tumor em média de 300-350 mm³. Ver Tabela 13, abaixo. O primeiro grupo consistiu de quatro ratinhos de controlo com um volume médio de tumor de 312 mm³. A dois destes ratinhos implantaram-se intravenosamente (IV) e a outros dois intratumoralmente (IT), 200 μ l e 50 μ l de uma solução veículo, respectivamente. O segundo grupo com um volume médio de tumor de 345 mm³ consistiu de quatro ratinhos aos quais se implantaram intravenosamente 200 μ l de células de HPP por ratinho (2×10^7 células). O último grupo, no qual se implantaram IT 50 μ l de

células de HPP por ratinho consistia também de quatro ratinhos com um volume de tumor médio de 332 mm³.

Tabela 13: Grupos experimentais para a experiência de supressão de tumor *in vivo*.

Animal #	Grupo de tratamento de HPP	Volume de tumor ao dia de implantação de HPP
Grupo 1 (Controlo)		
1	IV 1	457
2	IT 2	429
3	IT 3	214
4	IV 4	147
	Média:	312
Grupo 2 (Implantação de células IV)		
5	1	466
6	2	209
7	3	217
8	4	487
	Média:	345
Grupo 3 (Implantação de células IT)		
9	1	491
10	2	256
11	3	296
12	4	285
	Média:	332
IV - implantação de 200 µL; IT - implantação de 50 µL.		

Ao Dia 66, 14 dias após a implantação de células de HPP, terminou-se o estudo devido a volumes de tumor elevados.

6.6.2. Resultados

Mediram-se os volumes de tumor (TV) até ao Dia 66 (dia 14 após implantação de células de HPP) quando o TV do grupo de controlo atingiu uma média de 2921 mm³. O grupo de tratamento

IV no final do estudo tinha um TV médio de 2076 mm³, e o grupo IT tinha um TV de 2705 mm³. No que se refere à % de aumento de TV pós-tratamento, o grupo IT mostrou uma inibição modesta de 20% enquanto o grupo IV mostrou mais de 35% de inibição do crescimento de tumor em comparação com o grupo de controlo. A inibição no grupo IT era demonstrável. Ver FIG. 11.

Lisboa, 2015-02-23

REIVINDICAÇÕES

1. Células de perfusato placentário nucleadas humanas para utilização num método para tratamento de um tumor num indivíduo, onde as células de perfusato placentário nucleadas humanas compreendem células assassinas naturais intermédias placentárias CD56⁺, CD16⁻ e podem ser obtidas por perfusão de uma placenta humana que foi drenada de sangue de cordão umbilical e lavada para remover sangue residual para produzir perfusato placentário compreendendo células placentárias nucleadas; e isolamento das células placentárias nucleadas a partir do referido perfusato placentário.

2. Células de perfusato placentário nucleadas humanas para a utilização da reivindicação 1, onde as referidas células de perfusato compreendem pelo menos cerca de 50% de células assassinas naturais intermédias placentárias CD56⁺, CD16⁻ que exprimem um ou mais dos microARNs hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618 ou hsa-miR-99a a um nível detectavelmente mais elevado do que células assassinas naturais de sangue periférico.

3. Células de perfusato placentário nucleadas humanas para a utilização da reivindicação 2, onde as referidas células CD56⁺, CD16⁻ exprimem um ou mais de proteína aminopeptidase N, proteína apolipoproteína E, proteína de interação 1 atrofina-1, proteína inexina inx-3, proteína precursora de integrina alfa-2, proteína precursora de integrina beta-5, proteína precursora GP49B da glicoproteína de superfície de mastócito ou proteína de receptor 1 de rianodina; e onde as referidas células CD56⁺, CD16⁻ não exprimem uma ou mais de proteína precursora de receptor 4 de factor de crescimento fibroblástico, proteína semelhante a nucleótido 4 associada a imunidade, proteína precursora de integrina alfa-L, proteína precursora de integrina beta 2, proteína precursora de integrina beta 4, proteína precursora de transglicosilase lítica D de mureína ligada a membrana, proteína 8 relacionada com proteína de ligação de oxisterol ou proteína precursora de perforina 1.

4. Células de perfusato placentário nucleadas humanas para a utilização da reivindicação 1, onde as referidas células de perfusato são utilizadas numa proporção de cerca de 5 células de perfusato por célula tumoral.

5. Células de perfusato placentário nucleadas humanas para a utilização da reivindicação 1, onde as referidas células de perfusato são utilizadas numa proporção de cerca de 10 células de perfusato por célula tumoral.

6. Células de perfusato placentário nucleadas humanas para a utilização das reivindicações 1 a 5, onde o tumor é um cancro do sangue, ou onde o tumor é um tumor sólido, ou onde o tumor é carcinoma ductal primário, leucemia, leucemia de células T aguda, linfoma mielóide crónico (CML), leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica (CML), carcinoma do pulmão, adenocarcinoma do cólon, linfoma histiocítico, mieloma múltiplo, carcinoma colo-rectal, adenocarcinoma colo-rectal ou retinoblastoma.

7. Células assassinas naturais intermédias placentárias CD56⁺, CD16⁻ humanas para utilização num método para tratamento de um tumor num indivíduo, onde as referidas células assassinas naturais intermédias placentárias exprimem um ou mais dos microARNs hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618 ou hsa-miR-99a a um nível detectavelmente mais elevado do que células assassinas naturais de sangue periférico.

8. Células assassinas naturais intermédias placentárias CD56⁺, CD16⁻ humanas para a utilização da reivindicação 7, onde as referidas células assassinas naturais intermédias placentárias são postas em contacto com um composto imunomodulador numa quantidade e durante um tempo suficientes para as referidas células assassinas naturais intermédias placentárias exprimirem detectavelmente mais granzima B do que um número equivalente de células assassinas naturais intermédias placentárias não postas em contacto com o referido

composto imunomodulador, onde o referido composto imunomodulador é lenalidomida ou pomalidomida.

9. Células assassinas naturais intermédias placentárias CD56⁺, CD16⁻ humanas para a utilização da reivindicação 7, onde as referidas células assassinas naturais intermédias placentárias são postas em contacto com um composto imunomodulador numa quantidade e durante um tempo suficientes para as referidas células assassinas naturais intermédias placentárias exibirem detectavelmente mais citotoxicidade em relação às referidas células tumorais do que um número equivalente de células assassinas naturais intermédias placentárias não postas em contacto com o referido composto imunomodulador, onde o referido composto imunomodulador é lenalidomida ou pomalidomida.

10. Células assassinas naturais intermédias placentárias CD56⁺, CD16⁻ humanas para a utilização da reivindicação 8 ou 9, onde as referidas células assassinas naturais intermédias placentárias exprimem um ou mais de BAX, CCL5, CD68, CD8A, CSF2, FAS, GUSB ou IL2RA a um nível mais elevado do que um número equivalente de células assassinas naturais intermédias placentárias não postas em contacto com as referidas lenalidomida ou pomalidomida.

11. Células assassinas naturais intermédias placentárias CD56⁺, CD16⁻ humanas para a utilização da reivindicação 8 ou 9, onde as referidas células assassinas naturais intermédias placentárias exprimem um ou mais de BAX, CCL2, CCL3, CCL5, CSF1, CSF2, ECE1, FAS, GNLY, GUSB, GZMB, IL1A, IL2RA, IL8, IL10, LTA, PRF1, PTGS2, SKI ou TBX21 a um nível mais elevado do que um número equivalente de células assassinas naturais intermédias placentárias não postas em contacto com a referida lenalidomida ou pomalidomida.

12. Células assassinas naturais intermédias placentárias CD56⁺, CD16⁻ humanas para a utilização das reivindicações 7 a 11, onde o tumor é cancro do sangue, ou onde o tumor é um tumor sólido, ou onde o tumor é carcinoma ductal primário, leucemia, leucemia de células T aguda, linfoma mielóide crónico (CML), leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica (CML), carcinoma do pulmão, adenocarcinoma do cólon, linfoma

histiocítico, mieloma múltiplo, carcinoma colo-rectal, adenocarcinoma colo-rectal ou retinoblastoma.

13. Células assassinas naturais combinadas para utilização num método de tratamento de um tumor num indivíduo, onde as referidas células assassinas naturais combinadas compreendem células assassinas naturais intermédias placentárias CD56⁺, CD16⁻ isoladas a partir de perfusato placentário e células assassinas naturais isoladas a partir de sangue do cordão umbilical, onde o referido sangue do cordão umbilical é isolado a partir da placenta a partir da qual o referido perfusato placentário é obtido, e onde as referidas células assassinas naturais intermédias placentárias exprimem um ou mais dos microARNs hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618 ou hsa-miR-99a a um nível detectavelmente mais elevado do que células assassinas naturais de sangue periférico.

14. Células assassinas naturais intermédias placentárias CD56⁺, CD16⁻ humanas para a utilização da reivindicação 7 ou as células assassinas naturais combinadas para a utilização da reivindicação 13, onde as referidas células assassinas naturais intermédias placentárias compreendem:

um número detectavelmente mais elevado de células assassinas naturais CD3⁻CD56⁺CD16⁻ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico;

um número detectavelmente mais baixo de células assassinas naturais CD3⁻CD56⁺CD16⁺ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico;

um número detectavelmente mais elevado de células assassinas naturais CD3⁻CD56⁺KIR2DL2/L3⁺ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico;

um número detectavelmente mais baixo de células assassinas naturais CD3⁻CD56⁺NKp46⁺ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico;

um número detectavelmente mais elevado de células assassinas naturais CD3⁻CD56⁺NKp30⁺ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico;

um número detectavelmente mais elevado de células assassinas naturais CD3⁻CD56⁺2B4⁺ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico; ou

um número detectavelmente mais elevado de células assassinas naturais CD3⁻CD56⁺CD94⁺ do que um número equivalente de células assassinas naturais a partir de sangue periférico.

15. Células assassinas naturais combinadas para a utilização da reivindicação 13 ou 14, onde o tumor é cancro do sangue, ou onde o tumor é um tumor sólido, ou onde o tumor é carcinoma ductal primário, leucemia, leucemia de células T aguda, linfoma mielóide crónico (CML), leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica (CML), carcinoma do pulmão, adenocarcinoma do cólon, linfoma histiocítico, mieloma múltiplo, carcinoma colo-rectal, adenocarcinoma colo-rectal ou retinoblastoma.

Lisboa, 2015-02-23

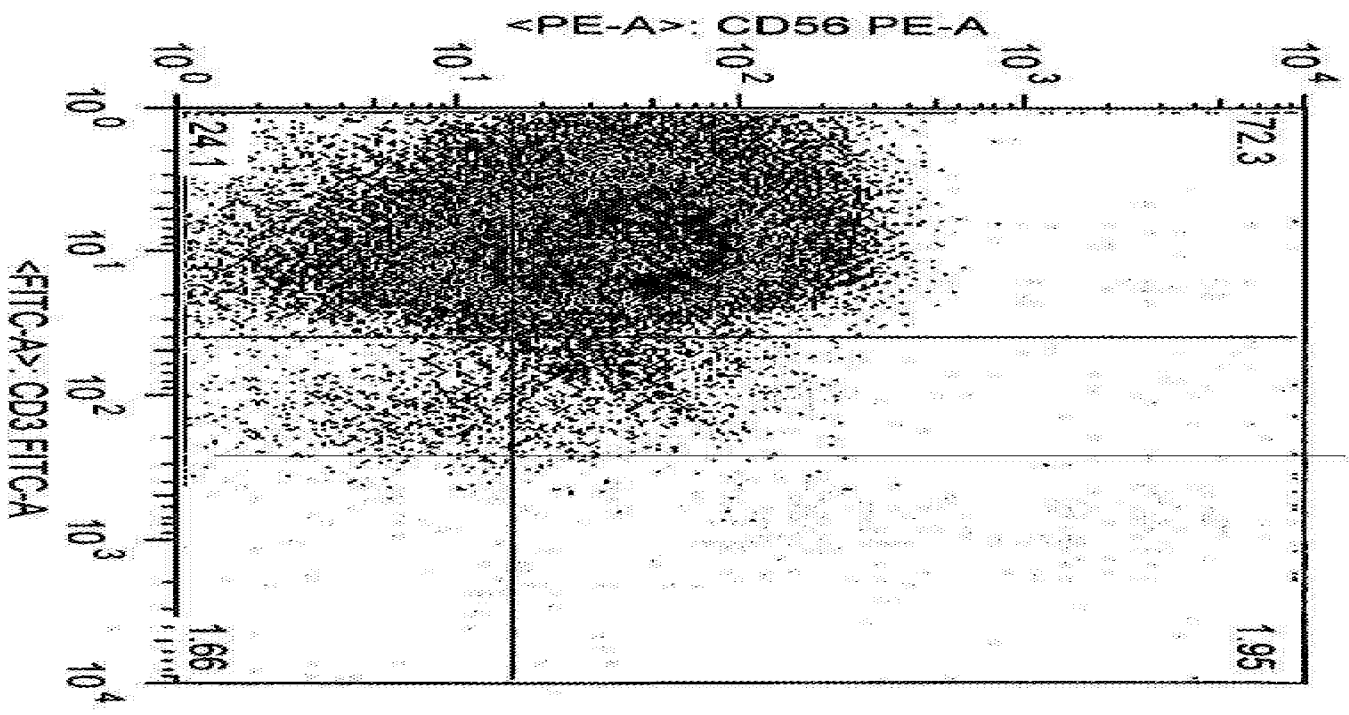


FIG. 1

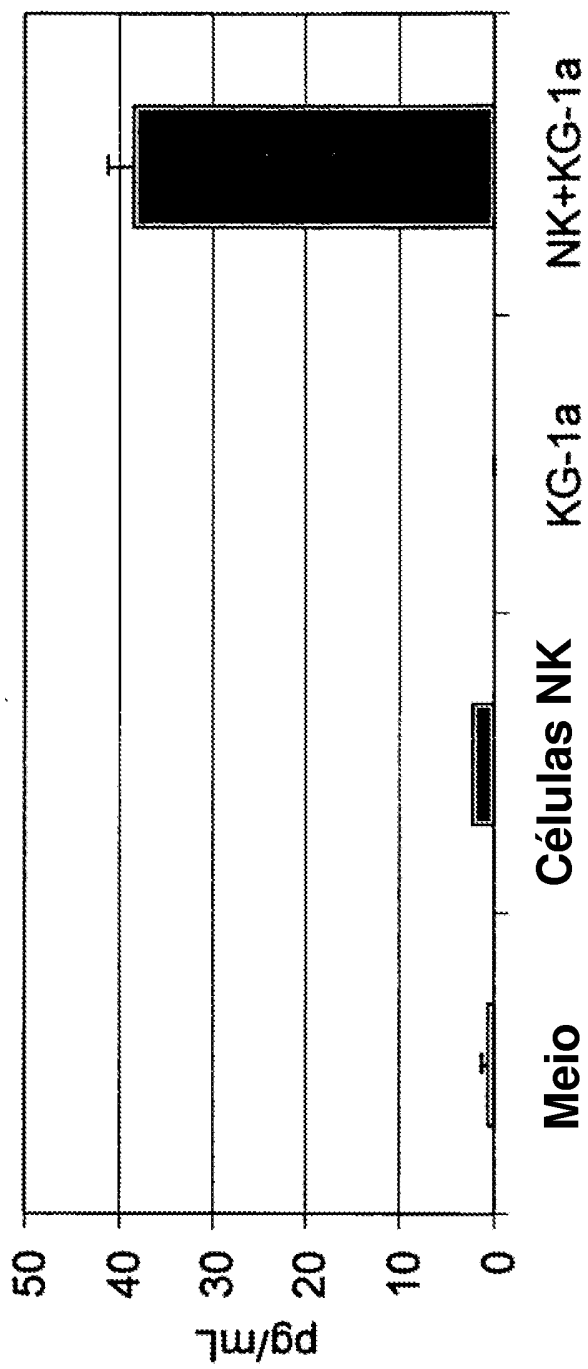


FIG. 2A

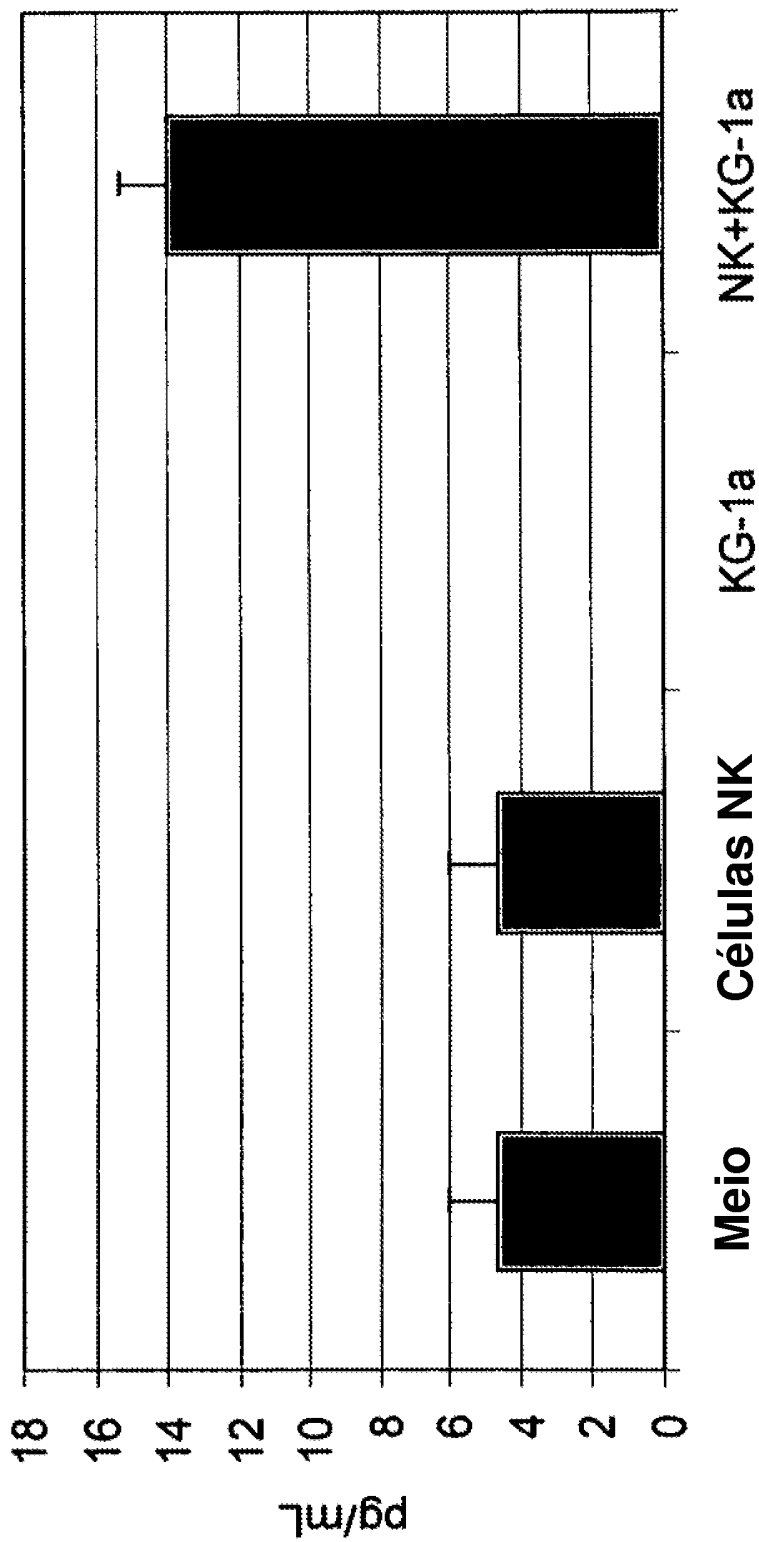


FIG. 2B

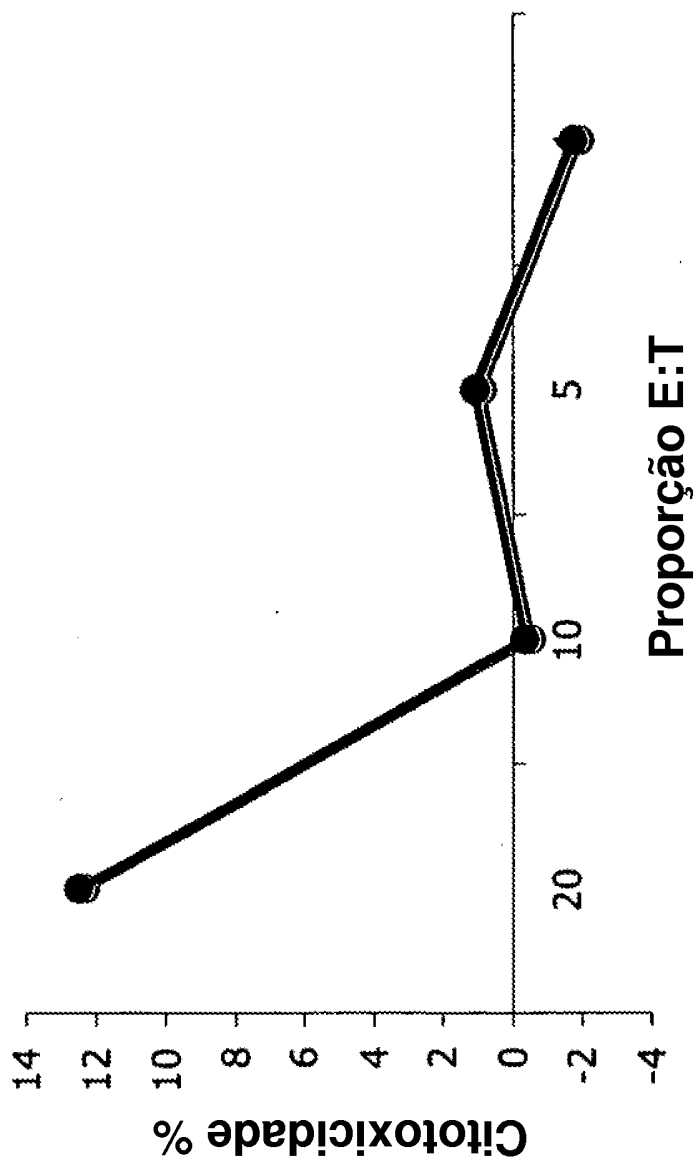


FIG. 3

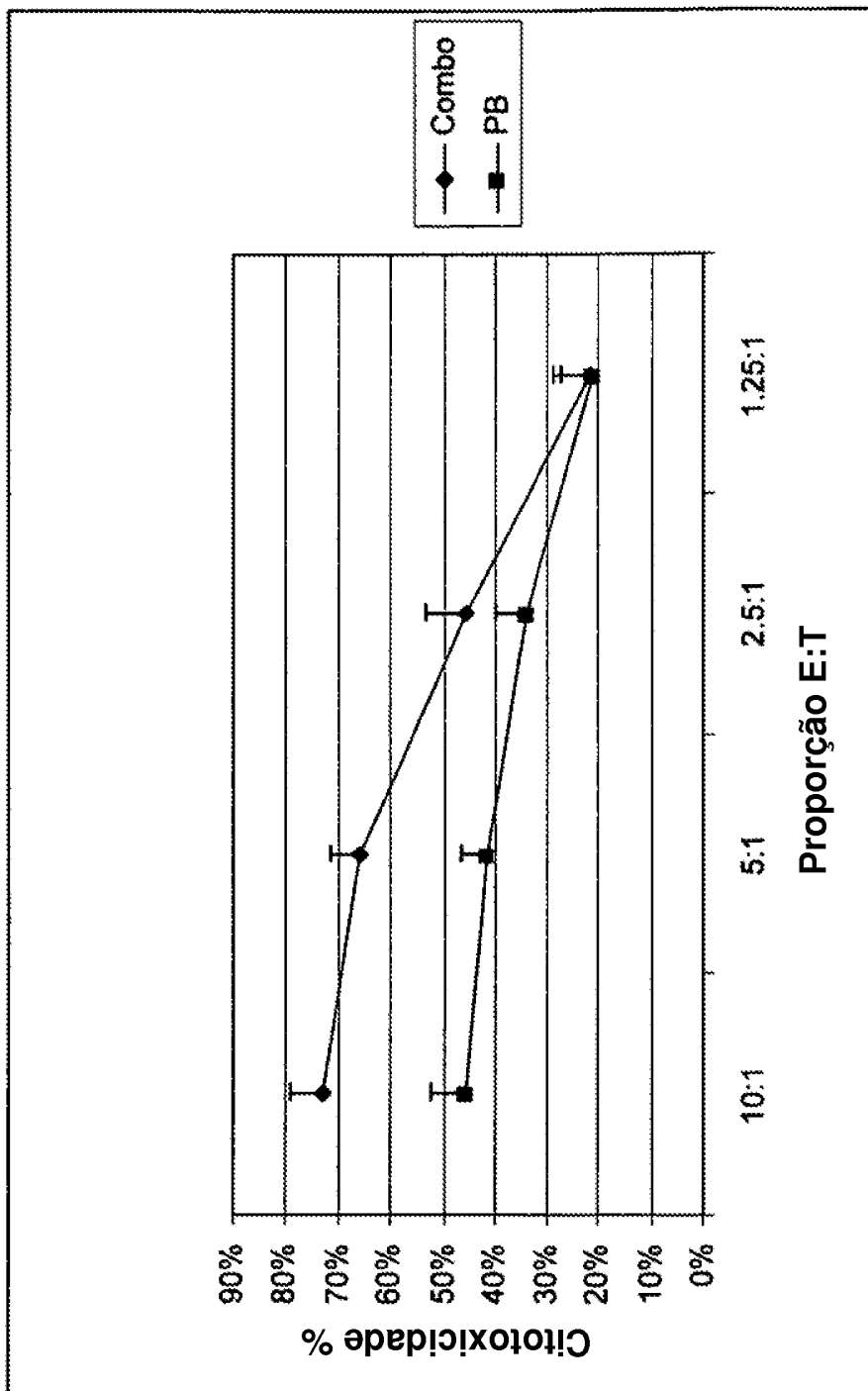


FIG. 4

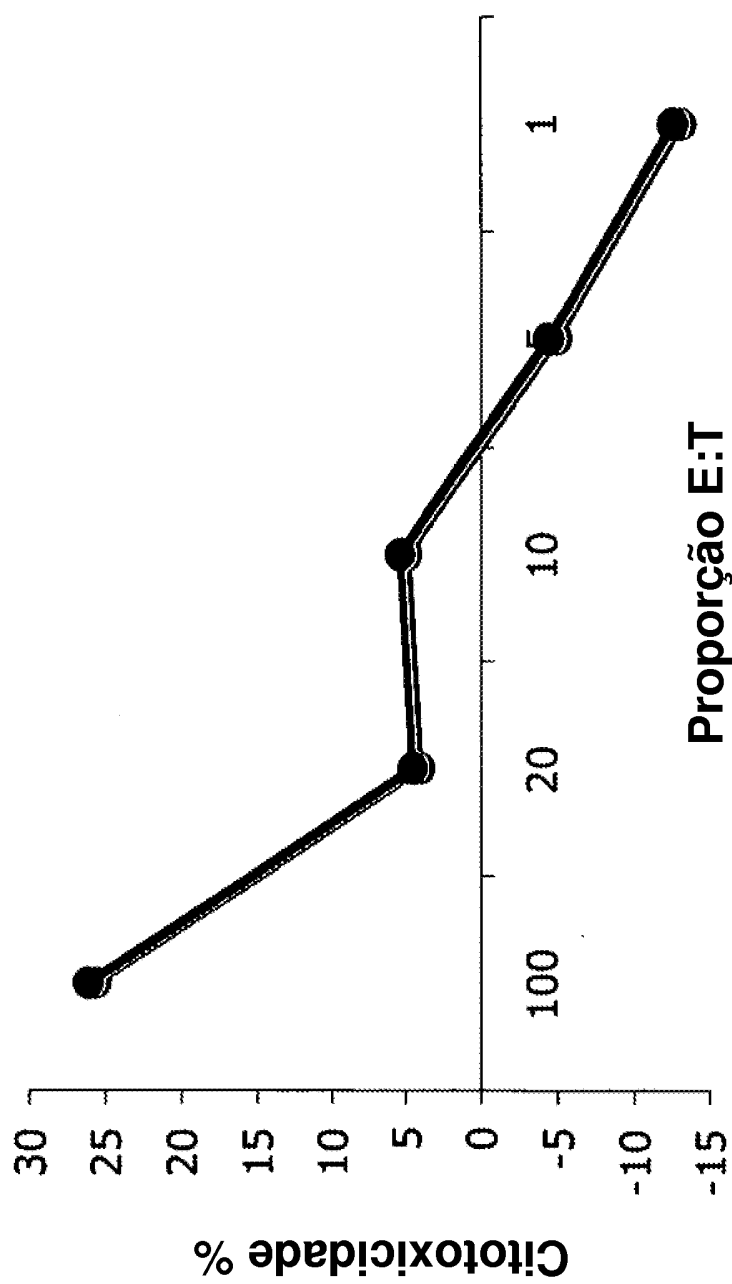
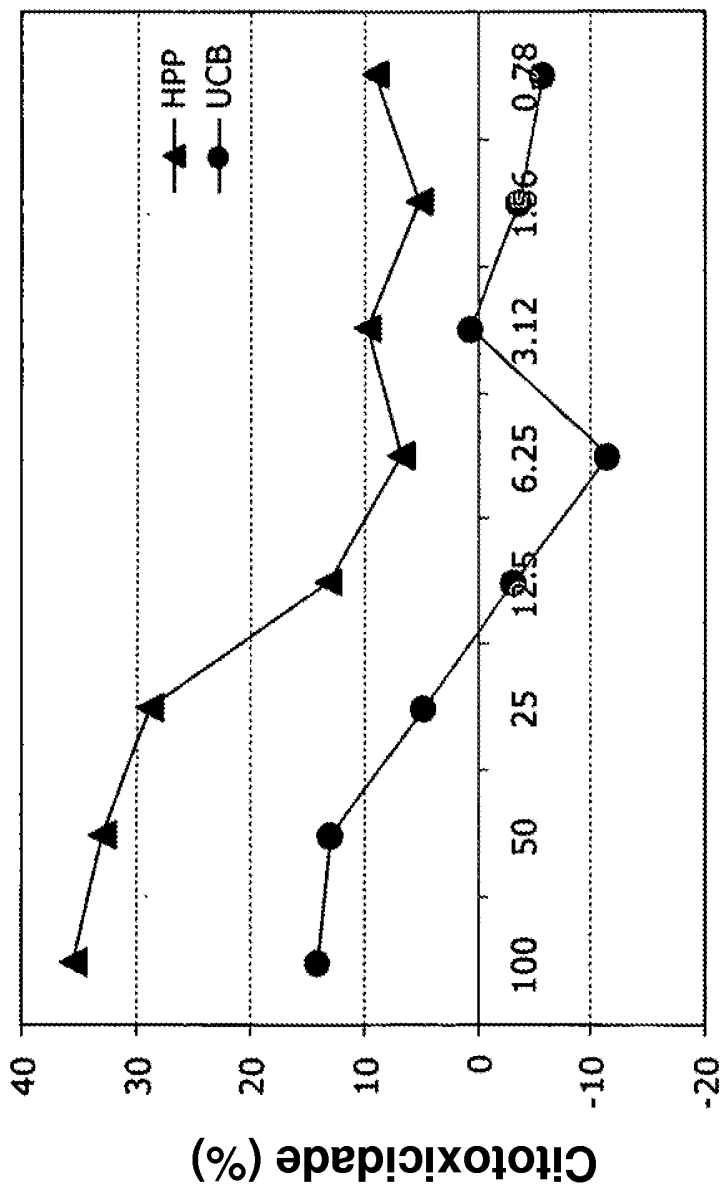


FIG. 5



Efeitor : Alvo

FIG. 6

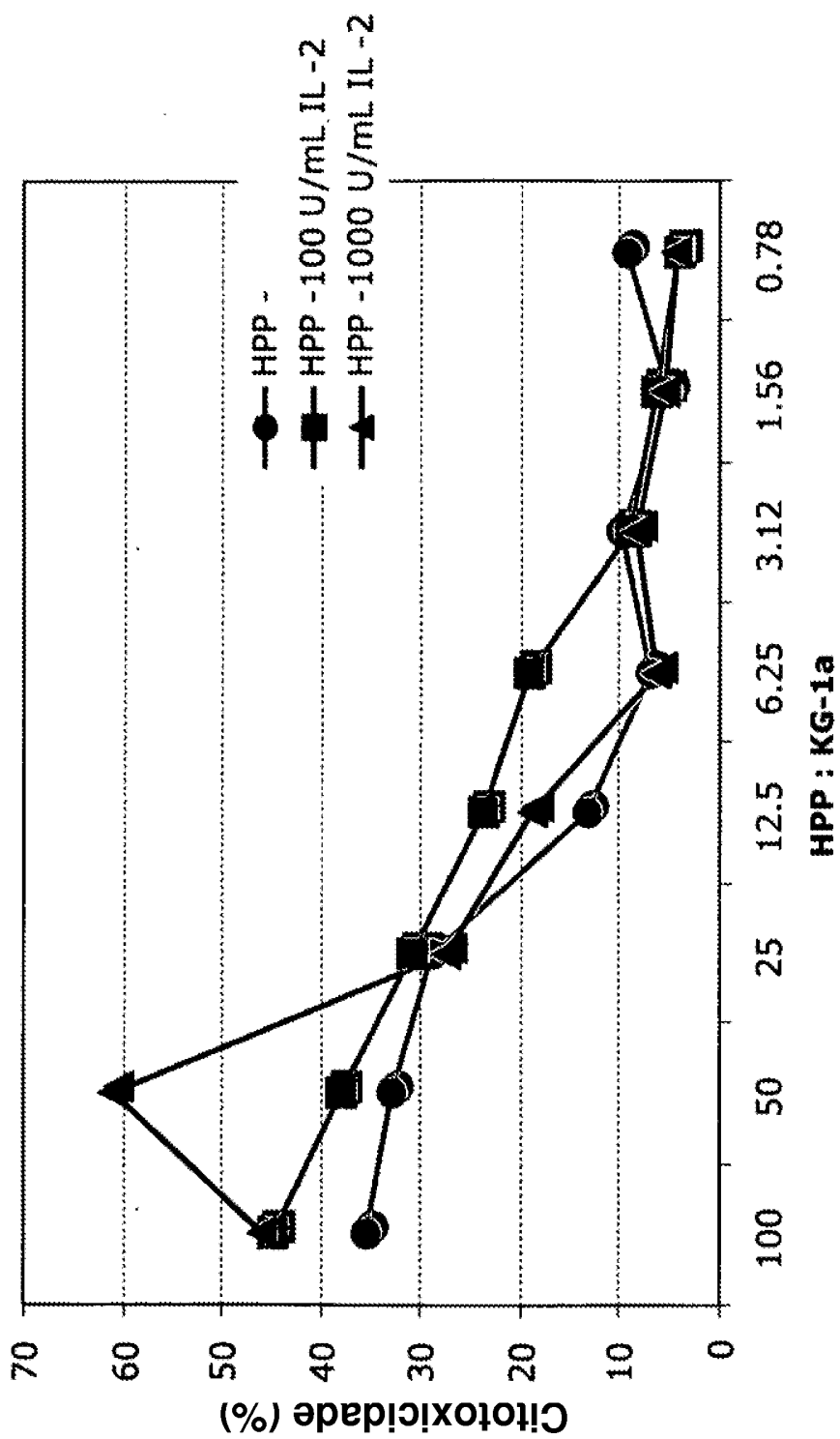
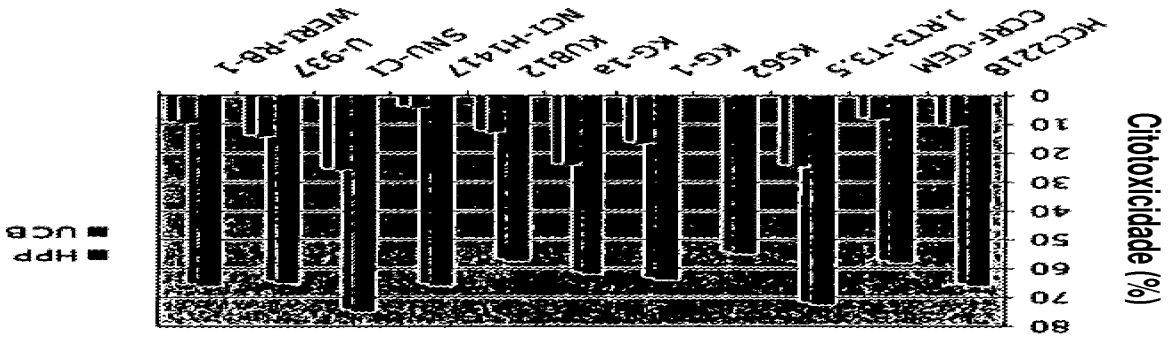
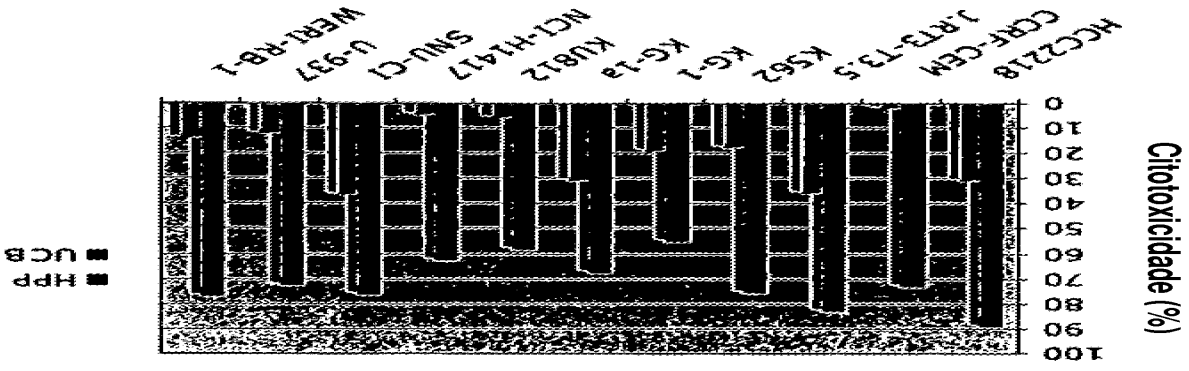


FIG. 7

A



B



FIGS. 8A, 8B

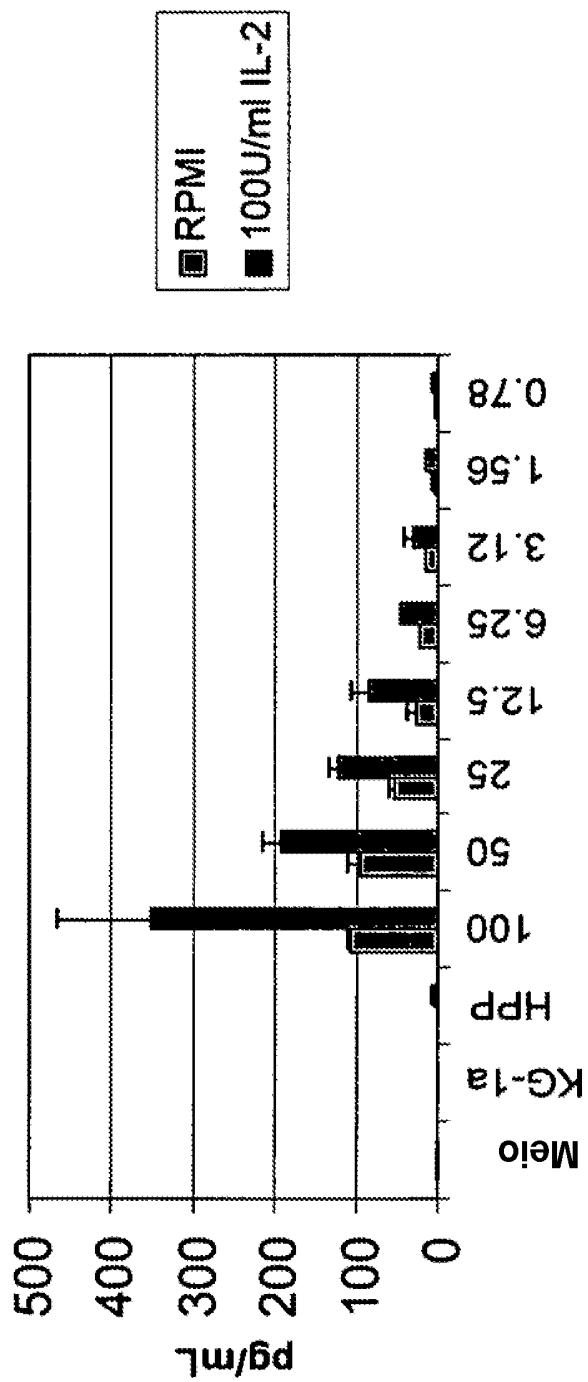
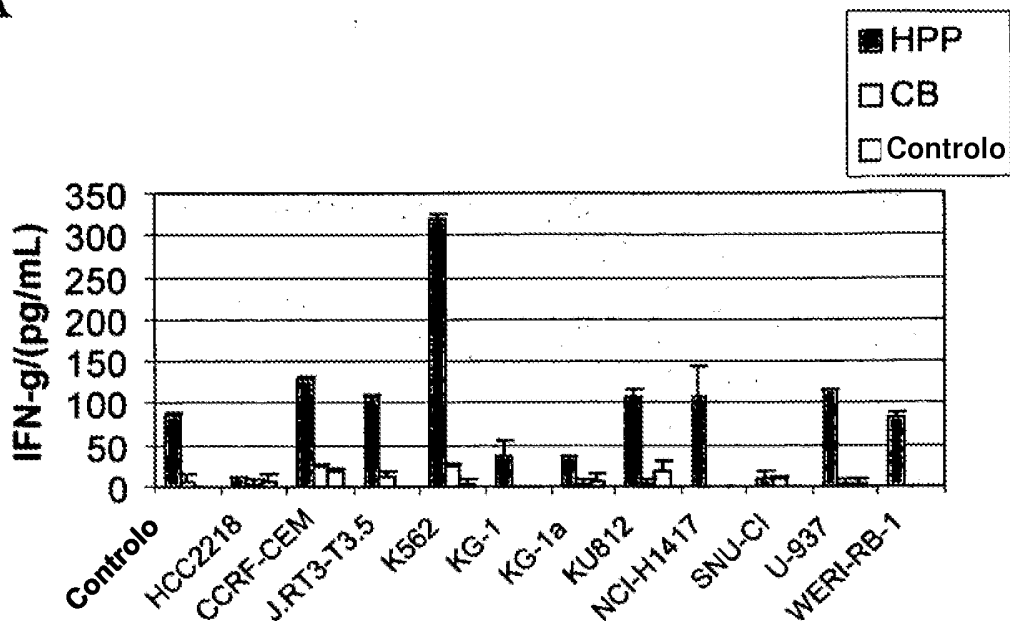
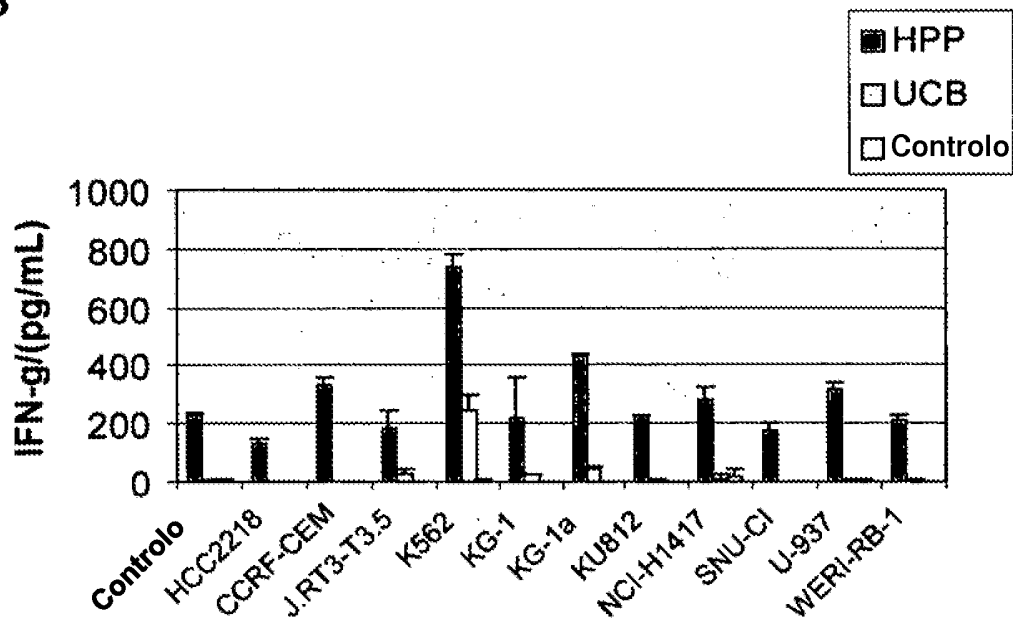


FIG. 9

A



B



FIGS. 10A, 10B

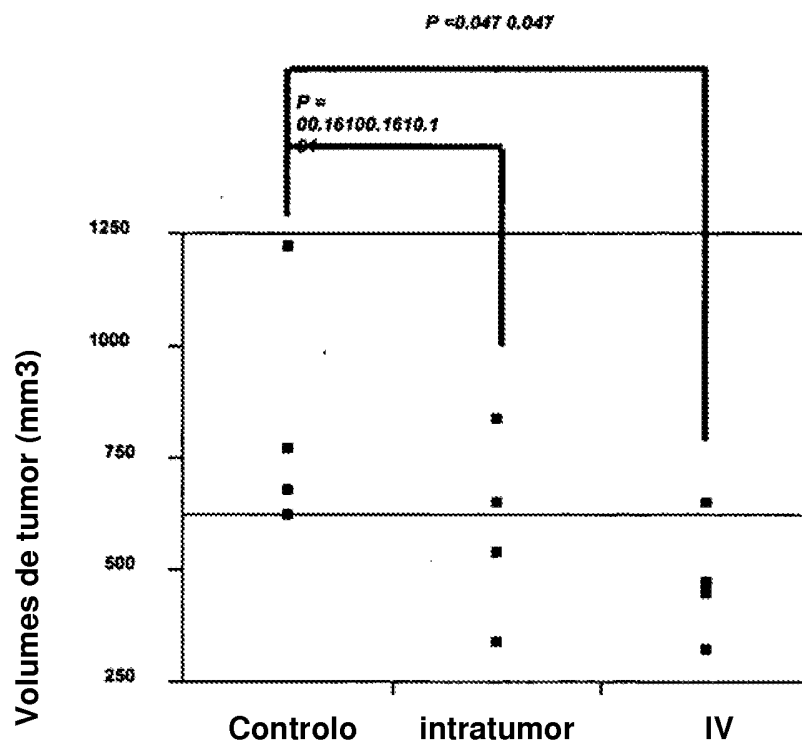


FIG. 11