



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

(11) PI 0923068-8 B1



(22) Data do Depósito: 19/12/2009

(45) Data de Concessão: 25/05/2021

(54) Título: USO DE CÉLULAS DERIVADAS DE TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL PARA TRATAR UM PACIENTE TENDO UMA DOENÇA, DISTÚRBIO OU INJÚRIA PULMONAR

(51) Int.Cl.: A61K 35/44; C12N 5/073.

(30) Prioridade Unionista: 19/12/2008 US 61/139,425.

(73) Titular(es): ADVANCED TECHNOLOGIES AND REGENERATIVE MEDICINE, LLC.

(72) Inventor(es): DAVID C. COLTER; ANTHONY J. KIHM; CHRISTINE K. WARD; ANNA GOSIEWSKA.

(86) Pedido PCT: PCT US2009068881 de 19/12/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/071864 de 24/06/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 20/06/2011

(57) Resumo: USO DE COMPOSIÇÕES PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS E DISTÚRBIOS DE PULMÃO E PULMONARES, AS REFERIDAS COMPOSIÇÕES, E KIT. A presente invenção refere-se a composições e métodos de usar células derivadas de tecido de cordão umbilical para estimular e sustentar angiogênese de tecido pulmonar, para melhorar o fluxo sanguíneo para o tecido pulmonar, para regenerar, reparar, e melhorar tecido pulmonar danificado por doença, distúrbio e/ou injúria pulmonar, e para proteger o tecido pulmonar de dano causado por doença, distúrbio e/ou injúria pulmonar em um paciente.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**USO DE CÉLULAS DERIVADAS DE TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL PARA TRATAR UM PACIENTE TENDO UMA DOENÇA, DISTÚRBIO OU INJÚRIA PULMONAR**".

Referência Cruzada a Pedidos Relacionados

[0001] Este pedido reivindica benefício ao Pedido de Patente Provisional dos Estados Unidos Nº 61/139.425, depositado em 10 de dezembro de 2008, os teores do qual está incorporado por referência aqui em sua totalidade.

Campo da Invenção

[0002] A presente invenção refere-se ao campo de terapia regenerativa ou com base em célula para distúrbios, doenças e lesões pulmonares.

Antecedentes da Invenção

[0003] Várias publicações incluindo patentes, pedidos publicados e artigos técnicos são citados ao longo da especificação. Cada destas publicações citadas está incorporada por referência aqui, em sua totalidade.

[0004] A doença pulmonar, tanto crônica quanto aguda, continua sendo uma causa significativa de morbidez e mortalidade em todo o mundo. A doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) é a quarta causa principal de morte no mundo (Spurzem e Rennard, Semin Respir Crit Care Med, 2005; 26: 142-153) e pode ser causada pelo estreitamento anatômico das vias aéreas ou bloqueio das vias aéreas com muco que interfere com a respiração normal. Adicionalmente, a doença pulmonar intersticial, também conhecida como fibrose pulmonar, é classificada como uma doença restritiva que inclui uma variedade de distúrbios pulmonares crônicos. O controle da doença pulmonar crônica inclui terapia com fármaco, terapia de oxigênio, cirurgia, e reabilitação pulmonar.

[0005] Ao mesmo tempo em que 90% dos pacientes de COPD são fumantes, somente 10% dos fumantes desenvolvem a doença, sugerindo que a predisposição genética pode ser um fator prognóstico importante. (Siafakas e Tzortzaki, *Respir Med*, 2002 Aug.; 96(8): 615-24). A doença pulmonar do fumante é caracterizada por inflamação ativa crônica, hipersecreção com muco das vias aéreas, e enfisema (MacNee, *Proc Am Thorac Soc*, 2005; 2(4): 258-66; descrição 290-1) e é somente parcialmente reversível sob cessação do hábito de fumar. (Spurzem e Rennard, *Semin Respir Crit Care Med*, 2005; 26: 142-153). A inflamação das vias aéreas e parênquima pulmonar desempenham um papel importante na patogênese de doença pulmonar obstrutiva crônica. A fumaça de cigarro foi mostrada induzir a inflamação pulmonar e finalmente levar ao COPD mesmo que a exposição à fumaça do cigarro tenha parado.

[0006] Enfisema é um dos fatores principais determinando a morbidade e mortalidade em doença pulmonar obstrutiva crônica. Esta doença é caracterizada, por exemplo, pela perda de elasticidade do tecido pulmonar, de destruição das estruturas que suportam os tecidos pulmonares tal como alvéolos, e destruição de capilares que alimentam os alvéolos. Esta destruição pode ser causada por enzimas inflamatórias, por exemplo, elastina. Enfisema é definido como o aumento do espaço de ar periférico no pulmão (incluindo alvéolos e bronquíolos respiratórios), que é acompanhado pela destruição das estruturas da parede alveolar. A incidência de pacientes com enfisema aumentou nas décadas passadas como um resultado do aumento em poluentes ambientais, fumaça de cigarro, e outras exposições a substâncias nocivas. O padrão atual de cuidado hoje demonstra que somente o transplante de pulmão pode fornecer remediação para enfisema grave. Nesse aspecto continua uma necessidade de um método adequado e útil para tratar, reparar e/ou melhorar o dano do

pulmão em pacientes com enfisema, tal como enfisema induzido por elastase.

[0007] Os modelos de animal expostos a fumaça de cigarro foram estudados para investigar a patologia e a eficácia de várias intervenções terapêuticas. Infelizmente, estes estudos somente demonstraram sucesso limitado. Parte do problema é que as cepas de camundongo e rato geralmente utilizadas mostram secreção mucosa e inflamação somente moderada em resposta a fumaça de cigarro. (Guerassimov, A, e outros, *Am J Respir Crit Med*, 2004 Nov. 1; 170(9): 974-80. Epub 2004 Jul. 28) e as lesões correspondentes são rapidamente reversíveis. Os roedores de laboratório saudáveis podem, portanto possuir uma capacidade extraordinária de compensar e regenerar a função pulmonar em seguida a uma lesão, que pode sustentar sua resistência relativa ao desenvolvimento de COPD. Recentemente foi mostrado que os ratos com hipersensibilidade espontânea geneticamente predispostos (SH) exibem fenótipos (por exemplo, inflamação sistêmica, hipercoagulação, tensão oxidativa e função imune suprimida) que são também encontrados em pacientes de COPD. (Yu, B, e outros., *Inhal Toxicol*, Maio de 2008; 20(7): 623-33). Portanto, o modelo de rato de SH pode oferecer um modelo mais relevante de COPD experimental.

[0008] A doença pulmonar restritiva é uma das causas mais comuns de morbidez e mortalidade e tem três etiologias principais, câncer pulmonar, pneumonia e fibrose pulmonar. A fibrose pulmonar Idiopática (IPF) é uma doença incapacitante caracterizada por dispneia progressiva e está associada com uma taxa elevada de mortalidade, fibrose do tecido fixo progressiva, distorção arquitetural, e perda de função. (Ortiz, LA, e outros., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 8 de julho de 2003, 2003; 100(14): 8407-11. Epub 2003 Jun. 18). Um excesso de citocinas profibróticas ou uma deficiência em citocinas antifibróticas esteve envolvido no processo patológico. Nos Estados Unidos, as

estimativas de prevalência para fibrose pulmonar idiopática variam de três a seis casos por cem mil pessoas. Atualmente, nenhuma terapia eficaz para reverter ou retardar o curso da doença está disponível. A maioria dos tratamentos, tal como corticosteroides, imunossupressores, imunomoduladores, ou agentes antifibróticos, procura suprimir a inflamação, porém nenhum foi provado alterar a progressão da doença de IPF. Portanto, uma necessidade significativa existe para o desenvolvimento de novas terapias visando retardar ou deter a fibrose ao mesmo tempo em que aumentando a regeneração e reparo de pulmão endógeno.

[0009] Descobriu-se que as células-tronco mesenquimais (MSCs) podem se diferenciar em células epiteliais alveolares em pulmões lesionados de camundongos feridos com bleomicina (BLM), e o enxerto de MSCs pode suprimir a inflamação e deposição de colágeno em tecido pulmonar danificado. (Zhao, F, e outros, Transplant Proceedings, junho de 2008.; 40(5): 1700-1705; Ortiz, LA, e outros, Proc Natl Acad Sci U S A., 8 de julho de 2003; 100(14):8407-I I, Epub 2003 Jun. 18; Rojas e outros., Am J Respir Cell Mol Biol, 2005; 33:145). BLM é um antibiótico citostático com atividade antitumor e é um composto bem-reconhecido para estudar fibrose pulmonar em modelos de animal. Ele induz a lesão da célula epitelial alveolar e inflamação no pulmão, levando a fibrose pulmonar.

[00010] A lesão pulmonar aguda (ALI) e síndrome da angústia respiratória aguda (ARDS) também continuam sendo causas significantes de morbidez e mortalidade na rotina de cuidado intensivo. ALI e ARDS são doenças sérias caracterizadas pelo início abrupto de hipoxemia com edema pulmonar difuso em resposta a lesão direta (por exemplo, afogamento, pneumonia, gases tóxicos inalados, e contusão pulmonar) ou lesão indireta (por exemplo, sepse grave, transfusão, choque, e pancreatite). ALI e ARDS são atualmente tratados por

ventilação mecânica e cuidado sustentador.

[00011] A terapia com célula é um dos campos mais excitantes em medicina translacional e está se desenvolvendo um uma nova plataforma terapêutica para tratar um vasto grupo de distúrbios clínicos. Durante os últimos cinco anos, o campo de terapias de célula em doença pulmonares continuou a crescer rapidamente. Vários estudos demonstraram a facilidade de empregar a terapia de célula para tratar doença pulmonar. Por exemplo, células progenitoras endoteliais circulantes (EPCs) podem contribuir com a regeneração de vasculatura pulmonar doente e estão sendo investigadas em pacientes com hipertensão pulmonar. (Diller, G P, e outros, *Circulation*, 2008 10 de junho, 117(23): 3020-30, Epub 2 de junho de 2008). Além disso, recentes publicações demonstram que as células-tronco mesenquimais (MSCs) também suprimem a inflamação e lesão pulmonar e em vários modelos de camundongos de doenças pulmonares mediadas imunes e inflamatórias. (Weiss, D J, e outros, *Proc Am Thorac. Soc.*, 15 julho de 2008; 5(5):637-67). Apesar destas descobertas promissoras, pouca atenção foi colocada sobre o desenvolvimento de uma terapia de célula para ALI.

[00012] Atualmente, há interesse no uso de células-tronco, que podem se dividir e se diferenciar, ou células do músculo de outras fontes, incluindo células do músculo liso e esquelético, para ajudar no reparo ou reversão de dano de tecido devido às doenças, distúrbios ou lesões pulmonares. O transplante de células-tronco pode ser utilizado como uma ferramenta clínica para reconstituir um tecido-alvo, desse modo restaurando a funcionalidade fisiológica e anatômica. A aplicação de tecnologia de célula-tronco é amplamente variante, incluindo construção de tecido, liberação de terapia de gene, e terapêuticos celulares, isto é, liberação de agentes bioterapêuticos a um local-alvo através de células vivas exogenamente fornecidas ou componentes

celulares que produzem ou contêm tais agentes. A identificação de células-tronco estimulou a pesquisa visada na geração seletiva de tipos celulares específicos para medicina regenerativa.

[00013] Um fornecimento confiável, bem-caracterizado e abundante de populações substancialmente homogêneas de tais células tendo a capacidade de diferenciar em uma formação de tecido pulmonar, incluindo estruturas vasculares, seria uma vantagem em uma variedade de aplicações diagnósticas e terapêuticas para reparo, regeneração, proteção e melhora do pulmão, e para melhora do fluxo sanguíneo e permuta de oxigênio/CO₂ antes, durante ou subsequente ao dano pulmonar devido às doenças, distúrbios, e/ou lesões pulmonares.

Sumário da Invenção

[00014] Um aspecto da invenção caracteriza métodos de tratar um paciente tendo doenças, distúrbios, e/ou lesões pulmonares. Tais doenças, distúrbios, e/ou lesões incluem, porém não estão limitados a, doenças pulmonares obstrutivas crônicas (COPD), fibrose pulmonar, lesão pulmonar aguda (ALI), síndrome da angústia respiratória aguda (ARDS), e os danos associados a isto.

[00015] Um aspecto da invenção caracteriza um método de tratar um paciente tendo doença, distúrbio e/ou lesão pulmonar, o método compreendendo administrar ao paciente células derivadas de tecido de cordão umbilical em uma quantidade eficaz para tratar a doença, distúrbio e/ou lesão pulmonar, e dano associado a isto.

[00016] Em uma modalidade particular, a doença, distúrbio, e/ou lesão pulmonar é obstrutiva, restritiva, e/ou causada de lesões tais como aquelas associadas com ou levando a ALI e/ou ARDS. Em certas modalidades, as células são induzidas *in vitro* a diferenciar-se em células de tecido pulmonar, por exemplo, músculo liso vascular, pericito, ou células de linhagem vascular do endotélio, antes da administração. Em outras modalidades, as células são geneticamente construídas para

produzir um produto de gene que promova o tratamento de uma doença, distúrbio e/ou lesão pulmonar.

[00017] Em algumas modalidades do método, as células são administradas com pelo menos um outro tipo de célula, que possa incluir as células do tecido pulmonar, por exemplo, células progenitoras do pulmão, células de músculo liso vascular, células progenitoras de músculo liso vascular, pericito, células endoteliais vasculares, células progenitoras de endotélio vascular, ou outras células-tronco multipotentes ou pluripotentes. O outro tipo de célula pode ser administrado simultaneamente com, antes ou após as células derivadas do tecido de cordão umbilical.

[00018] Em outras modalidades, as células são administradas com pelo menos um outro agente, o qual pode ser um agente antitrombogênico, um agente anti-inflamatório, um agente imunossupressor, um agente imunomodulatório, pró-angiogênico, ou um agente antiapoptótico, por exemplo. O outro agente pode ser administrado simultaneamente com, antes ou após as células derivadas do tecido de cordão umbilical.

[00019] As células são preferivelmente administradas em ou próximas aos sítios da doença, distúrbio, e/ou lesão pulmonar, porém podem também ser administradas em locais distais a tais sítios. Eles podem ser administrados por injeção, infusão, um dispositivo implantado no paciente, ou por implantação de uma matriz ou armação contendo as células. As células podem exercer um efeito trófico, tal como proliferação, no tecido pulmonar do paciente. As células podem induzir a migração de células do tecido pulmonar, por exemplo, células de músculo liso vascular, células endoteliais vasculares, células progenitoras pulmonares, pericito, células progenitoras de músculo liso vascular, ou células progenitoras de endotélio vascular para o sítio ou sítios de doença, distúrbio, e/ou lesão pulmonar.

[00020] Outro aspecto da invenção caracteriza composições farmacêuticas e kits para tratar um paciente tendo uma doença, distúrbio, e/ou lesão pulmonar, compreendendo um veículo, diluente, e/ou tampão farmacêuticamente aceitáveis, e as células derivadas de tecido do cordão umbilical ou preparações feitas de tais células derivadas de tecido do cordão umbilical. Em algumas modalidades preferidas, as preparações compreendem FGF e HGF. As composições farmacêuticas e kits são designados e/ou formulados para praticar os métodos da invenção como descrito acima.

[00021] De acordo com outro aspecto da invenção, os métodos descritos acima podem ser praticados utilizando uma preparação feita de células derivadas de tecido de cordão umbilical, em que a preparação compreende um lisado de célula de células derivadas de tecido de cordão umbilical, uma matriz extracelular das células derivadas de tecido de cordão umbilical ou um meio condicionado no qual as células derivadas de tecido de cordão umbilical tenham crescido. É preferido que tais preparações compreendam FGF e HGF. Outro aspecto da invenção envolve praticar a invenção com produtos das células derivadas de tecido de cordão umbilical, por exemplo, fatores tróficos.

[00022] Outros aspectos da invenção caracterizam as composições farmacêuticas e kits contendo preparações compreendendo lisados de célula, matrizes extracelulares ou meios condicionados das células derivadas de tecido de cordão umbilical. As composições podem também compreender um veículo, diluente, e/ou tampão farmacêuticamente aceitável, como conhecido na técnica. Outros aspectos da invenção caracterizam o tratamento com composições farmacêuticas e kits compreendendo produtos das células derivadas de tecido de cordão umbilical.

[00023] Outras características e vantagens da invenção serão entendidas por referência à descrição detalhada e exemplos que

seguem.

Breve Descrição dos Desenhos

[00024] A figura 1 mostra a concentração de proteína total BALF: A proteína total foi medida utilizando um Ensaio de Proteína BCA Pierce. Cada ponto de dados representa medições obtidas de um único animal. As linhas horizontais representam a média de todas as medições. Análise de teste t de Student foi realizada. Os dados são mostrados na forma tabular abaixo (Tabela 8).

[00025] A figura 2a mostra uma Análise de Citocina/Quimiocina de Homogenato de Pulmão: as concentrações de vinte e duas citocinas/quimiocinas diferentes foram determinadas para homogenato de pulmão utilizando um kit de 22 contas múltiplas de camundongo (Miliporo) seguindo o protocolo do fabricante e analisadas utilizando a máquina BioRad Bioplex. As barras de dados representam a média de seis amostras. Os dados são mostrados na forma tabular abaixo (figura 3).

[00026] A figura 2b mostra uma Análise de Citocina/Quimiocina de BALF: as concentrações de vinte e duas citocinas/quimiocinas diferentes foram determinadas para BALF utilizando um kit de 22 contas múltiplas de camundongo (Millipore) seguindo o protocolo do fabricante e analisadas utilizando a máquina BioRad Bioplex. As barras de dados representam a média de seis amostras. Os dados são mostrados na forma tabular abaixo (figura 4).

[00027] A figura 3 mostra uma Análise de Citocina/ Quimiocina de Homosenato de pulmão: As concentrações de vinte e duas citocinas/quimiocinas diferentes foram determinadas para homogenato de pulmão utilizando um kit de 22 contas múltiplas de camundongo (Millipore) seguindo o protocolo do fabricante e analisadas utilizando a máquina BioRad Bioplex.

[00028] A figura 4 mostra uma análise de Citocina/Quimiocina de

BALF: as concentrações de vinte e duas citocinas/quimiocinas diferentes foram determinadas para BALF utilizando um kit de 22 contas múltiplas de camundongo (Millipore) seguindo o protocolo do fabricante e analisadas utilizando a máquina BioRad Bioplex.

Descrição Detalhada

[00029] Na seguinte descrição detalhada das modalidades ilustrativas, referência é feita aos desenhos acompanhantes que formam uma parte da mesma. Estas modalidades são descritas em detalhes suficientes para permitir que aqueles versados na técnica pratiquem a invenção, e é entendido que outras modalidades podem ser utilizadas e que faixas lógicas, estruturais, mecânicas, elétricas e químicas podem ser feitas sem afastar-se do espírito ou escopo da invenção. Para evitar detalhes não necessários para permitir que aqueles versados na técnica pratiquem as modalidades descritas aqui, a descrição pode omitir certas informações conhecidas por aqueles versados na técnica. A seguinte descrição detalhada, portanto, não deve ser considerada em um sentido limitante.

[00030] Vários termos são utilizados em toda a especificação e reivindicações. A tais termos deve ser dado seu significado comum na técnica a menos que de outro modo indicado. Outros termos especificamente definidos devem ser considerados de uma maneira de acordo com a definição fornecida aqui.

[00031] "Tecido pulmonar" pode incluir, porém não está limitado a, todas as estruturas do tecido pulmonar e tecidos associados, incluindo, porém não limitado a, veias, artérias, vasos, capilares, e células do tipo que são parte de, ou associadas com, tais estruturas; tecido pulmonar e pleural; e músculo liso vascular, pericito, e fenótipos e/ou linhagens endoteliais vasculares.

[00032] Como utilizado aqui, "doenças, distúrbios e lesões pulmonares ou respiratórias", incluem, porém não estão limitados a,

doenças pulmonares obstrutivas, doenças pulmonares restritivas, infecções do trato respiratório (superior e inferior), tumores respiratórios, doenças da cavidade pleural, e doenças vasculares pulmonares. O dano para o tecido pulmonar causado por estas doenças, distúrbios e/ou lesões pode ser caracterizado como dano pulmonar no escopo da presente invenção. Além disso, o tecido pulmonar danificado abrangido pela invenção inclui todas as estruturas de tecido pulmonar e tecidos associados, incluindo veias, artérias, vasos, capilares, e células do tipo que são parte de, ou associado com, tais estruturas. "Doenças pulmonares obstrutivas" podem incluir COPD, fibrose cística, bronquiectasia, bronquiolite, enfisema e aspergilose broncopulmonar alérgica. COPD, por exemplo, é causado por gases ou partículas nocivas (mais geralmente de fumo), que ativa uma resposta inflamatória anormal no pulmão. A resposta inflamatória nas vias aéreas superiores é conhecida como bronquite crônica, que é diagnosticada clinicamente quando pessoas regularmente tosse com expectoração. No alvéolo, a resposta inflamatória causa destruição do tecido do pulmão, um processo conhecido como enfisema. Deve ser percebido que estes tecidos são aqueles associados com COPD uma vez que pertence a presente invenção. A etiologia de COPD inclui, porém não está limitado a, fumo de tabaco, exposições ocupacionais às poeiras do local de trabalho (por exemplo, mineração de carvão, mineração de ouro, a indústria têxtil de algodão e indústria química), poluição do ar, e genéticas.

[00033] "Doenças pulmonares restritivas", como utilizado aqui, são também conhecidas como doenças pulmonares intersticiais (ILDs). Muitas destas são idiopáticas. Os exemplos incluem: fibrose pulmonar idiopática, pneumonia intersticial idiopática (vários tipos), sarcoidose, pneumonia eosinofílica, linfangioleiomiomatose, histiocitose de célula de Langerhan pulmonar, e proteínaose alveolar pulmonar. ILDs afetam

o interstício do pulmão: epitélio alveolar, endotélio capilar pulmonar, membrana basal, tecidos perivasculares e perilinfáticos. A maioria dos tipos de ILDs envolve fibrose.

[00034] Os tumores respiratórios incluem tumores tanto malignos quanto benignos. Os tumores malignos incluem, por exemplo, câncer pulmonar da célula pequena, câncer pulmonar da célula não pequena (adenocarcinoma, carcinoma da célula escamosa, e carcinoma não diferenciado da célula grande), linfoma, bem como outros cânceres. Os tumores benignos são raros, porém incluem hamartoma pulmonar e má formações congênitas, por exemplo.

[00035] Como utilizado aqui, "lesão pulmonar aguda" (ALI) é uma lesão pulmonar heterogênea difusa caracterizada por hipoxemia, edema pulmonar não cardiogênico, baixa complacência pulmonar e vazamento capilar frequente. ALI é causado por qualquer estímulo de inflamação local ou sistêmica. A síndrome da angústia respiratória aguda (ARDS) é mais grave do que ALI. Como utilizado aqui, ALI e ARDS podem ser caracterizados pelo início abrupto de hipoxemia com edema pulmonar difuso em resposta a lesão direta ou lesão indireta. Como utilizado aqui, "lesão direta" inclui, porém não está limitada a, lesões pulmonares decorrentes de episódios de afogamento, pneumonia, gases tóxicos inalados, contusões pulmonares. Como utilizado aqui, "lesão indireta" pode ser várias sepse, transfusão, choque, e pancreatite, por exemplo. Estas lesões que levam a ALI e ARDS resultam em rompimento da interface alveolar-capilar, vazamento de fluido rico em proteína no interstício e espaço alveolar, liberação extensiva de citocinas, e migração de neutrófilos.

[00036] As doenças, distúrbios e lesões pulmonares abrangidos pelos métodos da presente invenção são conhecidos na técnica. As características de cada, incluindo complicações, etiologias, e tratamentos associados, são conhecidas por aqueles versados na

técnica. Isto inclui doenças, distúrbios e lesões pulmonares não especificamente descritas aqui, uma vez que elas se aplicariam a doenças, distúrbios e lesões pulmonares restritivos e obstrutivos.

[00037] As células utilizadas na presente invenção são geralmente referidas como células pós-parto ou células derivadas de pós-parto (PPDCs). As células são mais especificamente "células derivadas do umbigo" ou "células derivadas do cordão umbilical" (UDC), ou "células derivadas do tecido do cordão umbilical" (UTC). Além disso, as células podem ser descritas como sendo células-tronco ou progenitoras, o último termo sendo utilizado no sentido mais amplo. O termo "derivado" é utilizado para indicar que as células foram obtidas de sua fonte biológica e crescidas e de outro modo manipuladas *in vitro* (por exemplo, cultivadas em um meio de crescimento para expandir a população e/ou produzir a linhagem celular). As manipulações *in vitro* de células do tronco umbilical e as únicas características das células derivadas do umbigo da presente invenção são descritas em detalhes abaixo.

[00038] As células-tronco são células não diferenciadas definidas pela capacidade de uma única célula tanto se autorrenovar, quanto se diferenciar produzir células progênes, incluindo progenitores autorrenovadores, progenitores não renovadores, e células terminalmente diferenciadas. As células-tronco são também caracterizadas por sua capacidade de se diferenciar *in vitro* em células funcionais de várias linhagens celulares de múltiplas camadas de germinativas (endoderma, mesoderma e ectoderma), bem como para dar origem aos tecidos de múltiplas camadas germinativas em seguida ao transplante, e para contribuir substancialmente com a maioria, se não todos, os tecidos em seguida a injeção em blastocistos.

[00039] As células-tronco são classificadas de acordo com seu potencial de desenvolvimento como: (1) totipotente; (2) pluripotente; (3)

multipotente; (4) oligopotente; e (5) unipotente. As células totipotentes são capazes de dar origem a todos os tipos de célula embriônica e extraembriônica. As células pluripotentes são capazes de dar origem a todos os tipos de célula embriônica. As células multipotentes incluem aquelas capazes de dar origem a um subgrupo de linhagens celular, porém todas em um tecido, órgão, ou sistema fisiológico particular. Por exemplo, as células-tronco hematopoiéticas (HSC) podem produzir progênie que inclui HSC (autorrenovação), progenitores oligopotentes restritos a células sanguíneas, e todos os tipos de célula e elementos (por exemplo, plaquetas) que são componentes normais do sangue. As células que são oligopotentes podem dar origem a um subgrupo mais restrito de linhagens celulares do que as células-tronco multipotentes. As células que são unipotentes são capazes de dar origem a uma linhagem de célula única (por exemplo, células-tronco espermatogênicas).

[00040] As células-tronco são também categorizados com base na fonte da qual elas são obtidas. Uma célula-tronco de adulto é geralmente uma célula não diferenciada multipotente encontrada no tecido compreendendo múltiplos tipos de célula diferenciada. A célula-tronco de adulto pode se autorrenovar. Sob circunstâncias normais, pode também se diferenciar para produzir os tipos de célula especializadas do tecido do qual ela se originou, e possivelmente outros tipos de tecido. Uma célula-tronco embriônica é uma célula pluripotente da massa celular interna de um embrião de estágio de blastocisto. Uma célula-tronco fetal é uma que se origina de tecidos ou membranas fetais. Uma célula-tronco pós-parto é uma célula multipotente ou pluripotente que se origina substancialmente do tecido extraembriônico disponível após o nascimento, isto é, o cordão umbilical. Descobriu-se que estas células possuem aspectos característicos de células-tronco pluripotentes, incluindo proliferação rápida e o potencial para

diferenciação em muitas linhagens de célula. As células-tronco pós-parto podem ser derivadas de sangue (por exemplo, como são aquelas obtidas de sangue do cordão umbilical) ou não derivadas do sangue (por exemplo, como obtido dos tecidos não sanguíneos do cordão umbilical e placenta).

[00041] Vários termos são utilizados para descrever células em cultura. "Cultura de célula" refere-se geralmente às células tomadas de um organismo vivo e crescidas em condições controladas ("em cultura" ou "cultivadas"). Uma "cultura de célula primária" é uma cultura de células, tecidos, ou órgãos tomados diretamente de um(uns) organismo(s) antes da primeira subcultura. As células são "expandidas" em cultura quando elas são colocadas em um meio de crescimento sob condições que facilitem a divisão e/ou crescimento de célula, resultando em uma população maior das células. Quando as células são expandidas em cultura, a taxa de proliferação celular é algumas vezes medida pela quantidade de tempo necessário para as células dobrarem de número. Isto é referido como "tempo de duplicação."

[00042] O termo "linhagem celular" geralmente refere-se a uma população de células formada por um ou mais subcultivos de uma cultura celular primária. Cada rodada de subcultivo é referida como uma passagem. Quando as células são subcultivadas, elas são referidas como tendo sido "passadas". Uma população específica de células, ou uma linhagem celular, é algumas vezes referida ou caracterizada pelo número de vezes que ela tenha sido passada. Por exemplo, uma população de célula cultivada que foi passada dez vezes pode ser referida como uma cultura P10. A cultura primária, isto é, a primeira cultura em seguida ao isolamento de células de tecido, é designada P0. Em seguida a primeira subcultura, as células são descritas como uma cultura secundária (P1 ou passagem 1). Após a segunda subcultura, as células se tornam uma cultura terciária (P2 ou passagem 2), e assim por

diante. Será entendido por aqueles versados na técnica que podem haver muitas duplicações de população durante o período de passagem; portanto o número de duplicações de população de uma cultura é maior do que o número de passagem. A expansão de células (isto é, o número de duplicações de população) durante o período entre a passagem depende de muitos fatores, incluindo, porém não limitado a, densidade da sementeação, substrato, meio, condições de crescimento, e tempo entre a passagem.

[00043] "Diferenciação" é o processo pelo qual uma célula não especializada ("não associada") ou menos especializada adquire as características de uma célula especializada, tal como uma célula nervosa ou uma célula do músculo, por exemplo. Uma "célula diferenciada" é uma que tenha assumido uma posição mais especializada ("associada") na linhagem de uma célula. O termo "associado", quando aplicado ao processo de diferenciação, refere-se a uma célula que prosseguiu na série de reação de diferenciação para um ponto onde, sob circunstâncias normais, continuará a diferenciar em um tipo de célula específico ou subgrupo de tipos de célula, e não pode, sob circunstâncias normais, se diferenciar em um tipo de célula diferente ou reverter para um tipo de célula menos diferenciado. "Desdiferenciação" refere-se ao processo pelo qual uma célula se reverte para uma posição menos especializada (ou associada) na linhagem de uma célula. Como utilizado aqui, a "linhagem" de uma célula define a hereditariedade da célula, isto é, cujas células vêm de e cujas células podem dar origem a. A linhagem de uma célula coloca a célula dentro de um esquema hereditário de desenvolvimento e diferenciação.

[00044] Em um amplo sentido, uma "célula progenitora" é uma célula que tem a capacidade de criar progênie que são mais diferenciados do que o próprio, e ainda mantém a capacidade de reabastecer o conjunto

de progenitores. Por esta definição, as células-tronco propriamente ditas são também células progenitoras, uma vez que são os precursores mais imediatos para células terminalmente diferenciadas. Ao referir-se como células da presente invenção, como descrito em maiores detalhes abaixo, esta ampla definição de célula progenitora pode ser utilizada. Em um sentido mais estreito, uma célula progenitora é geralmente definida como uma célula que é intermediária na série de reações de diferenciação, isto é, surge de uma célula-tronco e é intermediária na produção de um tipo de célula madura ou subgrupo de tipos de célula. Este tipo de célula progenitora é geralmente não capaz de se autorrenovar. Consequentemente, se este tipo de célula é referido aqui, ela será referida como uma "célula progenitora não renovadora" ou como uma "célula precursora ou progenitora intermediária".

[00045] Vários termos são utilizados aqui com respeito ao transplante de célula ou tecido; ou terapia de substituição de célula. Os termos "transferência de autólogo", "transplante de autólogo", "autoenxerto" e similares se referem aos tratamentos em que o doador de célula ou transplante é também o recipiente de célula ou transplante. Os termos "transferência alogeneica", "transplante alogeneico", "aloenxerto" e similares referem-se aos tratamentos em que o doador de célula ou transplante é da mesma espécie como o recipiente, porém não é o mesmo indivíduo. Uma transferência de célula na qual as células do doador foram histocompativelmente combinadas com um recipiente é algumas vezes referida como uma "transferência singeneica". Os termos "transferência xenogeneica", "transplante xenogeneico", "xenoenxerto" e similares referem-se ao transplante em que o doador de célula ou transplante é de uma espécie diferente do que o recipiente.

[00046] Os termos "veículo farmacologicamente aceitável" ou "meio farmacologicamente aceitável" que podem ser utilizados alternadamente

com os termos "veículo biologicamente compatível" ou "meio biologicamente compatível" geralmente refere-se a reagentes, células, compostos, materiais, composições, e/ou formas de dosagem que são não somente compatíveis com as células e outros agentes a serem administrados terapeuticamente, porém também são, adequados para uso em contato com os tecidos de seres humanos e animais sem toxicidade, irritação, resposta alérgica excessivas, ou outra complicação comensurada com uma relação de benefício/risco razoável. Como descrito em maiores detalhes aqui, veículos farmacêuticamente aceitáveis adequados para uso na presente invenção incluem materiais líquidos, semissólidos (por exemplo, géis) e sólidos (por exemplo, armações e matrizes de célula, tubos, folhas e outros tais materiais conhecidos na técnica e descritos em maiores detalhes aqui). Estes materiais semissólidos e sólidos podem ser designados para resistir a degradação no corpo (não biodegradável) ou eles podem ser designados para degradar no corpo (biodegradável, bioerosível). Um material biodegradável pode também ser biorreabsorvível ou bioabsorvível, isto é, pode ser dissolvido e absorvido em fluidos corpóreos (implantes solúveis em água são um exemplo), ou degradados e por último eliminados do corpo, ou por conversão em outros materiais ou quebrados e eliminados através de série de reações naturais. A taxa de biodegradação pode variar de acordo com a taxa de liberação desejada uma vez implantada no corpo.

[00047] Um "meio condicionado" é um meio no qual uma célula específica ou população de células foi cultivada, e em seguida removida. Quando as células são cultivadas em um meio, elas podem secretar fatores celulares que podem fornecer suporte trófico a outras células. Tais fatores tróficos incluem, porém não estão limitados a, hormônios, citocinas, matriz extracelular (ECM), proteínas, vesículas, anticorpos, e grânulos. O meio contendo os fatores celulares é o meio

condicionado.

[00048] Geralmente, um "fator trófico" é definido como uma substância que promove sobrevivência, crescimento, proliferação e/ou maturação de uma célula, ou estimula a atividade aumentada de uma célula.

[00049] Como utilizado aqui, o termo "meio de crescimento" geralmente refere-se a um meio suficiente para cultivo de células derivadas de pós-parto. Em particular, um meio atualmente preferido para o cultivo das células da invenção compreende Meio Essencial Modificado de Dulbecco (DMEM). Particularmente preferido é DMEM com baixo teor de glucose (DMEM-LG) (Invitrogen, Carlsbad, Calif). O DMEM-LG é preferivelmente suplementado com soro, mais preferivelmente soro bovino fetal ou soro humano. Tipicamente, 15% (v/v) de soro bovino fetal (por exemplo, soro bovino fetal definido, Hyclone, Logan Utah) é adicionado, junto com antibióticos/antimicóticos (preferivelmente 100 Unidade/mililitro de penicilina, 100 miligramas/mililitro de estreptomicina, e 0,25 micrograma/mililitro de anfotericina B; (Invitrogen, Carlsbad, Calif.)), e 0,001% (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis Mo.). Em alguns casos diferentes meios de crescimento são utilizados ou diferentes suplementações são fornecidas, e estes são normalmente indicados no texto como suplementações para o meio de crescimento. Em certos meios quimicamente definidos as células podem ser crescidas sem soro presente de modo algum. Em tais casos, as células podem requerer certos fatores de crescimento, que podem ser adicionados ao meio para suportar e manter as células. Os fatores atualmente preferidos a serem adicionados para o crescimento em meios livres de soro incluem um ou mais dentre bFGF, EGF, IGF-I, e PDGF. Em modalidades mais preferidas, dois, três ou todos os quatro fatores são adicionados ao meio quimicamente definido ou livre de soro. Em outras modalidades, LIF é

adicionado ao meio livre de soro para suportar ou melhorar o crescimento das células.

[00050] O termo "condições de crescimento padrão," como utilizado aqui refere-se ao cultivo de células a 37°C, em uma atmosfera padrão compreendendo 5% de CO₂ e umidade relativa mantida em cerca de 100%. Ao mesmo tempo em que as condições anteriores são úteis para o cultivo, é para ser entendido que tais condições são capazes de ser variadas pelo versado o qual apreciará as opções disponíveis na técnica para cultivo de células.

[00051] O termo "quantidade eficaz" refere-se a uma concentração ou quantidade de um composto, material, ou composição, como descrito aqui, que é eficaz para obter um resultado biológico particular. Tais resultados incluem, porém não estão limitados à regeneração, reparo, ou melhora do tecido esquelético, a melhora do fluxo sanguíneo, e/ou o estímulo e/ou o suporte de angiogênese em pacientes com dano pulmonar de tais doenças, distúrbios e lesões no escopo desta invenção. Tal atividade eficaz pode ser obtida, por exemplo, administrando-se as células e/ou composições da presente invenção a pacientes com dano pulmonar como descrito aqui. Com respeito a administração de UTC a um paciente *in vivo*, uma quantidade eficaz pode variar de tão pouco quanto várias centenas ou menos, a tanto quanto vários milhões ou mais. Em modalidades específicas, uma quantidade eficaz pode ser de cerca de 10³ a cerca de 10¹¹ células mais especificamente, pelo menos cerca de 10⁴ células. Será apreciado que o número de células a ser administrado variará dependendo das especificidades da doença, distúrbio ou lesão pulmonar a ser tratada, incluindo, porém não limitado ao tamanho ou volume total/área de superfície a ser tratada, e a proximidade do sítio de administração ao local da região a ser tratada, entre outros fatores familiares com o biólogo medicinal.

[00052] Os termos "tratar", "tratando" ou "tratamento" refere-se a qualquer sucesso ou indícios de sucesso na atenuação ou melhora de uma lesão, patologia ou condição, incluindo qualquer parâmetro objetivo ou subjetivo tal como moderação, remissão, diminuição de sintomas ou tornando a lesão, patologia, ou condição mais tolerável ao paciente, tornando mais lenta a taxa de degeneração ou declínio, tornando o ponto final de degeneração menos debilitante, melhorando um bem-estar mental ou físico do paciente, ou prolongando a duração da sobrevivência. O tratamento ou melhora dos sintomas pode ser com base nos parâmetros objetivos ou subjetivos; incluindo os resultados de um exame físico, ou exame neurológico.

[00053] Os termos "período eficaz," "período de tempo eficaz" ou "condições eficazes" referem-se geralmente a um período de tempo ou outras condições controláveis (por exemplo, temperatura, umidade para métodos *in vitro*) necessárias ou preferidas para um agente ou composição farmacêutica para obter seu resultado pretendido.

[00054] Os termos "indivíduo," "paciente" ou "sujeito" são utilizados alternadamente aqui, e referem-se aos animais, preferivelmente mamíferos, e mais preferivelmente humanos, os quais são tratados com as composições farmacêuticas ou terapêuticas ou de acordo com os métodos descritos aqui.

[00055] O termo "matriz" como utilizado aqui geralmente refere-se a materiais biodegradáveis e/ou biorreabsorvíveis que são administrados como células a um paciente. A matriz pode agir como uma armação temporária até que substituída por células recentemente crescidas, tais como, músculo esquelético, pericito, músculo liso vascular, ou tecido endotelial vascular. Em algumas modalidades, a matriz pode fornecer a liberação prolongada de fatores tróficos ou outros agentes utilizados em conjunto com as células e pode fornecer uma estrutura para o desenvolvimento de crescimento de tecido no paciente. Em outras

modalidades, a matriz simplesmente fornece uma armação temporária para o desenvolvimento de tecido. A matriz pode estar na forma particulada (macropartículas maiores do que 10 microns em diâmetro ou micropartículas menores do que 10 microns em diâmetro), ou pode estar na forma de um implante tridimensional estruturalmente estável (por exemplo, uma armação). A matriz pode ser uma suspensão, hidrogel ou uma estrutura tridimensional tal como um cubo, cilindro, tubo, bloco, película, folha ou uma forma anatômica apropriada.

[00056] O termo "armação" como utilizado aqui geralmente refere-se a uma estrutura porosa tridimensional que fornece um modelo para crescimento de célula. A armação é feita de materiais biodegradáveis e/ou biorreabsorvíveis que se degradam com o passar do tempo no corpo. A duração de tempo levada para a armação degradar pode depender do peso molecular dos materiais. Desse modo, o material de peso molecular mais elevado pode resultar em armações de polímero que mantêm sua integridade estrutural durante períodos mais longos de tempo; ao mesmo tempo em que os pesos moleculares mais baixos resultam em liberação mais lenta e vidas de armação mais curtas. A armação pode ser feita por qualquer meio conhecido na técnica. Os exemplos de polímeros que podem ser utilizados para formar a armação incluem os polímeros naturais e sintéticos.

[00057] O termo "isolado" como utilizado aqui geralmente refere-se a uma célula que foi separada de seu ambiente natural. Este termo inclui separação física bruta de seu ambiente natural, por exemplo, remoção do animal doador. Em modalidades preferidas, uma célula isolada não está presente em um tecido, isto é, a célula é separada ou dissociada das células vizinhas com a qual ela está normalmente em contato. Preferivelmente, as células são administradas como uma suspensão de célula. Como utilizada aqui, a frase "suspensão de célula" inclui células que estão em contato com um meio e que tenham sido dissociadas, por

exemplo, submetendo-se um pedaço de tecido a trituração suave.

[00058] Em suas várias modalidades descritas aqui, a presente invenção caracteriza métodos e composições farmacêuticas para tratamento de doenças, distúrbios e/ou lesões pulmonares que utilizam células progenitoras e populações de célula derivadas de tecidos pós-parto, tecidos do umbigo em particular. Estes métodos e composições farmacêuticas são designados para estimular e sustentar a angiogênese, para melhorar o fluxo sanguíneo, para regenerar, reparar, e melhorar tecido pulmonar danificado por uma doença, distúrbio e/ou lesão pulmonar, e/ou para proteger o tecido pulmonar de tais doenças, distúrbios e/ou lesões. As células, populações de célula e preparações compreendendo lisados de célula, meios condicionados e similares, utilizados nas preparações farmacêuticas e métodos da presente invenção são descritos em detalhes nas Publicações de Patente US N^{os}. 2005/0032209, 2005/0058631 e 2005/0054098, e também aqui abaixo.

[00059] De acordo com os métodos descritos aqui, um cordão umbilical de mamífero é recuperado até ou logo após o término de uma gravidez de pré-termo ou termo completo, por exemplo, após expulsão do nascimento. O tecido pós-parto pode ser transportado do sítio de nascimento para um laboratório em um recipiente estéril tal como um frasco, béquer, prato de cultura, ou bolsa. O recipiente pode ter uma solução ou meio, incluindo, porém não limitado a uma solução de sal, tal como Meio Eagles Modificado de Dulbecco (DMEM) (também conhecido como Meio Essencial Mínimo de Dulbecco) ou salina tamponada de fosfato (PBS), ou qualquer solução utilizada para o transporte de órgãos utilizados para transplante, tal como solução de University of Wisconsin ou solução perfluoroquímica. Um ou mais agentes antibióticos e/ou antimicóticos, tais como, porém não limitados a, penicilina, estreptomicina, anfotericina B, gentamicina, e nistatina, podem ser adicionados ao meio ou tampão. O tecido pós-parto pode ser

enxaguado com uma solução anticoagulante tal como solução contendo heparina. É preferível manter o tecido em cerca de 4 a cerca de 10°C antes da extração do UTC. É ainda mais preferível que o tecido não seja congelado antes da extração do UTC.

[00060] O isolamento do UTC preferivelmente ocorre em um ambiente asséptico. O cordão umbilical pode ser separado da placenta por meios conhecidos na técnica. O sangue e resíduos são preferivelmente removidos do tecido pós-parto antes do isolamento do UTC. Por exemplo, o tecido pós-parto pode ser lavado com solução de tamponamento, incluindo, porém não limitado a salina tamponada de fosfato. O tampão de lavagem também pode compreender um ou mais agentes antimicótico e/ou antibiótico, incluindo, porém não limitado a penicilina, estreptomicina, anfotericina B, gentamicina, e nistatina.

[00061] O tecido pós-parto compreendendo um cordão umbilical, ou um fragmento ou seção do mesmo, é preferivelmente desagregado por força mecânica (forças de picadura ou cisalhamento). Em uma modalidade atualmente preferida, o procedimento de isolamento também utiliza um processo de digestão enzimática. Muitas enzimas são conhecidas na técnica por serem úteis para o isolamento de células individuais de matrizes de tecido complexas para facilitar o crescimento em cultura. As enzimas de digestão variam de fracamente digestiva (por exemplo, deoxirribonucleases e a protease neutral, dispase) para fortemente digestivo (por exemplo, papaína e tripsina), e estão comercialmente disponíveis. Uma lista não exaustiva de tais enzimas incluem atividades de enzima mucolítica, metaloproteases, proteases neutras, serina proteases (tais como tripsina, quimiotripsina, ou elastase), e deoxirribonucleases. Atualmente preferidas são atividades de enzima selecionadas de metaloproteases, proteases neutras e atividades mucolíticas. Por exemplo, colagenases são conhecidas por serem úteis para isolar várias células de tecidos. Deoxirribonucleases

podem digerir DNA de fita única e podem minimizar a formação de grumo de célula durante o isolamento. Métodos preferidos envolvem tratamento enzimático com collagenase e dispase, ou collagenase, dispase, e hialuronidase. O técnico versado apreciará que muitos tais tratamentos de enzima são conhecidos na técnica para isolar células de várias fontes de tecido, e é bem-equipado para auxiliar novas e adicionais enzimas ou combinações de enzimas para sua utilidade no isolamento das células da invenção. Os tratamentos de enzima preferidos podem ser de cerca de 0,5 a duas horas de duração ou mais longos. Em outras modalidades preferidas, o tecido é incubado em cerca de 37°C durante o tratamento de enzima da etapa de dissociação.

[00062] As células isoladas podem ser utilizadas para iniciar, ou semear, culturas de célula. As células isoladas são transferidas para vasos de cultura de tecido estéreis não revestidos ou revestidos com matriz extracelular ou ligantes tais como laminina, colágeno (nativo, desnaturado ou reticulado), gelatina, fibronectina, e outras proteínas de matriz extracelular. As células são cultivadas em qualquer meio de cultura capaz de sustentar o crescimento da célula tal como, porém não limitado a, DMEM (glicose elevada ou baixa), DMEM avançado, DMEM/MCDB 201, meio basal de Eagle, meio FIO de Ham (FIO), meio F-2 de Ham (F 12), meio de Dubelcco modificado de Iscove, Meio de crescimento de célula-tronco mesenquimal (MSCGM), DMEM/F12, RPMI 1640, e meio livre de soro/veículo vendido sob o nome comercial CELL-GRO-FREE (Mediatech, Inc., Herndon, Va.). O meio de cultura pode ser suplementado com um ou mais componentes incluindo, por exemplo, soro bovino fetal (FBS), preferivelmente cerca de 2-15% (v/v); soro equino (ES); soro humano (HS); beta-mercaptoetanol (BME ou 2-ME), preferivelmente cerca de 0,001% (v/v); um ou mais fatores de crescimento, por exemplo, fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento

de fibroblasto (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator-1 de crescimento semelhante a insulina (IGF-I), fator inibidor de leucócito (LIF) e eritropoietina (EPO); aminoácidos, incluindo L-valina; e um ou mais agentes antibióticos e/ou antimicótico para controlar a contaminação microbiana, tal como penicilina G, sulfato de estreptomicina, anfotericina B, gentamicina, e nistatina, sozinho ou em combinação. O meio de cultura preferivelmente compreende meio de crescimento (por exemplo, DMF-M com baixo teor de glicose, soro, BME e um agente antibiótico).

[00063] As células são semeadas em vasos de cultura em uma densidade para permitir o crescimento da célula. Em uma modalidade preferida, as células são cultivadas em cerca de 0 a cerca de 5 por cento em volume de CO₂ no ar. Em algumas modalidades preferidas, as células são cultivadas em cerca de 2 a cerca de 25 por cento de O₂ em ar, preferivelmente cerca de 5 a cerca de 20 por cento de O₂ em ar. As células preferivelmente são cultivadas em uma temperatura de cerca de 25 a cerca de 40°C e mais preferivelmente são cultivadas em 37°C. As células são preferivelmente cultivadas em uma incubadora. O meio no vaso de cultura pode ser estático ou agitado, por exemplo, utilizando um biorreator. O UTC é preferivelmente crescido em baixa tensão oxidativa (por exemplo, com a adição de glutathione, vitamina C, catalase, vitamina E, N-acetilcisteína). "Baixa tensão oxidativa", como utilizado aqui, refere-se às condições de nenhum ou mínimos danos de radicais livres às células cultivadas.

[00064] Os métodos para a seleção do meio de cultura mais apropriado, preparação de meio, e técnicas de cultura de célula são bem-conhecidos na técnica e são descritos em uma variedade de fontes, incluindo Doyle e outros., (eds.), 1995, Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures, John Wiley & Sons, Chichester; e Ho e Wang (eds.), 1991, Animal Cell Bioreactors, Butterworth-Heinemann, Boston,

que estão incorporados aqui por referência.

[00065] Em algumas modalidades da invenção, o UTC é passado, ou removido para um recipiente de cultura separado contendo meio fresco do mesmo ou um diferente tipo como aquele utilizado inicialmente, onde a população de células pode ser mitoticamente expandida. As células da invenção podem ser utilizadas em qualquer ponto entre a passagem 0 e senescência. As células preferivelmente são passadas entre cerca de 3 e cerca de 25 vezes, mais preferivelmente são passadas cerca de 4 a cerca de 12 vezes, e preferivelmente são passados 10 ou 11 vezes. A clonagem e/ou subclonagem podem ser realizadas para confirmar que uma população clonal de células foi isolada.

[00066] Em alguns aspectos da invenção, os tipos diferentes de célula presentes no tecido pós-parto são fracionados em subpopulações das quais o UTC pode ser isolado. O fracionamento ou seleção pode ser realizado utilizando técnicas padrões para separação celular incluindo, porém não limitado a, tratamento enzimático para dissociar o tecido pós-parto em suas células componentes, seguido por clonagem e seleção de tipos de célula específicos, incluindo, porém não limitados a: seleção com base nos marcadores morfológicos e/ou bioquímicos; crescimento seletivo de células desejadas (seleção positiva); destruição seletiva de células indesejadas (seleção negativa); separação com base em aglutinabilidade de célula diferencial na população misturada como, por exemplo, com aglutinina de soja; procedimentos de congelamento-descongelamento; propriedades de aderência diferencial das células na população misturada; filtração; centrifugação convencional e zonal; elutriação centrífuga (centrifugação contracorrente); separação de gravidade de unidade; distribuição contracorrente; eletroforese; e classificação de célula ativada por fluorescência (FACS).

[00067] O meio de cultura é mudado quando necessário. Por exemplo, cuidadosamente aspirando-se o meio do prato com uma

pipeta, e reabastecendo com meio fresco. A incubação é continuada até que um número suficiente ou densidade de células se acumule no prato. Por conseguinte, qualquer seção de tecido original explantado que existe pode ser removido e as células restantes separadas do prato por tripsinização utilizando técnicas padrões ou utilizando-se um raspador de célula. Após tripsinização, as células são coletadas, removidas para meio fresco e incubadas como acima. Em algumas modalidades, o meio é mudado pelo menos uma vez em aproximadamente 24 horas pós-tripsinização para remover qualquer célula flutuante. As células restantes em cultura são consideradas serem UTC.

[00068] O UTC pode ser crioconservado. Consequentemente, em uma modalidade preferida descrita em maiores detalhes abaixo, o UTC para transferência autóloga (para a mãe ou criança) pode ser derivado de tecidos pós-parto apropriados em seguida ao nascimento de uma criança, em seguida crioconservado de modo a estar disponível no evento que mais tarde são necessários para transporte.

[00069] O UTC pode ser caracterizado, por exemplo, por características de crescimento (por exemplo, capacidade de duplicação de população, tempo de duplicação, passagens para senescência), análise de cariótipo (por exemplo, cariótipo normal; linhagem maternal ou neonatal), citometria de fluxo (por exemplo, análise de FACS), imuno-histoquímica e/ou imunocitoquímica (por exemplo, para detecção de epitopos), perfil de expressão de gene (por exemplo, disposições de fragmento de gene; reação em cadeia de polimerase (por exemplo, PCR de transcriptase reversa, PCR de tempo real, e PCR convencional)), as disposições de proteína, secreção de proteína (por exemplo, por ensaio de coagulação de plasma ou análise de meio condicionado por PDC, por exemplo, por Ensaio Imunossorvente Ligado a Enzima (ELISA)), reação de linfócito misturada (por exemplo, como medido de estimulação de PBMCs), e/ou outros métodos conhecidos na técnica.

[00070] Os exemplos de UTC derivados de tecido do umbigo foram depositados com a Coleção de Cultura do Tipo Americano em 10 de Junho de 2004, e designado Números de Acesso ATCC como segue: (1) designação de cepa UMB 022803 (P7) foi designada N°. de Acesso PTA-6067; e (2) designação de cepa UMB 022803 (P17) foi designado o N°. de Acesso PTA-6068.

[00071] Em várias modalidades, o UTC possui uma ou mais das seguintes características: (1) elas requerem L-valina para crescimento em cultura; (2) elas são capazes de crescer em atmosferas contendo oxigênio de cerca de 5% a cerca de 20%; (3) elas têm o potencial para pelo menos cerca de 40 duplicações em cultura antes de atingir senescência; e (4) elas se prendem e expandem em vasos de cultura de tecido que são não revestidos, ou que são revestidos com gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina ou fibronectina.

[00072] Em certas modalidades o UTC possui um cariótipo normal, que é mantido quando as células são passadas. Os métodos para cariotipagem estão disponíveis e são conhecidos por aqueles versados na técnica.

[00073] Em outras modalidades, o UTC pode ser caracterizado por produção de certas proteínas, incluindo: (1) produção de pelo menos um fator de tecido, vimentina, e alfa-actina do músculo liso; e (2) produção de pelo menos um dentre marcadores de superfície de célula CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 e HLA-A₅B, C, quando detectados por citometria de fluxo. Em outras modalidades, o UTC pode ser caracterizado por falta de produção de pelo menos um dentre marcadores de superfície de célula CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G, e HLA-DR, DP, DQ, quando detectado por citometria de fluxo. Particularmente preferidas são as células que produzem pelo menos dois dentre: fator de tecido; vimentina; e alfa-actina do músculo liso.

Mais preferidas são aquelas células produzindo todas as três proteínas: fator de tecido; vimentina; e alfa-actina do músculo liso.

[00074] Em outras modalidades, o UTC pode ser caracterizado por expressão de gene, que é relativo a uma célula humana que é um fibroblasto, uma célula-tronco mesenquimal, ou uma célula da medula óssea da crista ilíaca, é aumentado para um gene codificando pelo menos um dentre: interleucina 8; reticulon 1; ligante 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (atividade de estimulação de crescimento de melanoma, alfa); ligante 6 de quimiocina (motivo C-X-C) (proteína quimiotática de granulócito 2); ligante 3 de quimiocina (motivo C-X-C); e fator de necrose de tumor, proteína alfa-induzida 3.

[00075] Em ainda outras modalidades, o UTC pode ser caracterizado por expressão de gene, que relativo a uma célula humana que é um fibroblasto, uma célula-tronco mesenquimal, ou uma célula da medula óssea da crista ilíaca, é reduzida para um gene codificando pelo menos um dentre: homeobox 2 de estatura pequena; proteína 2 de 27 kDa de choque térmico; ligante 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (fator 1 derivado de célula estromal); elastina (estenose aórtica supra-avalvular, síndrome de Williams-Beuren); mRNA de *Homo sapiens*; cDNA DKFZp586M2022 (de clone DKFZp586M2022); homeo box 2 da mesênquima (homeo box específico de interrupção de crescimento); homólogo 1 de homeobox sine oculis (*Drosophila*); cristalina, alfa B; ativador associado desgrenhado de morfogênese 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de ligação de plasminogênio); três homólogas de src (SH3) e domínio rico em cisteína; colesterol 25-hidroxilase; fator 3 de transcrição relacionado com runt; receptor de interleucina 11, alfa; realçador de C-endopeptidase de procolágeno; homólogo 7 frizado (*Drosophila*); gene hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabraquiona); proteína 5 de homeobox de iroquois; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína 2 de vesículo sináptico;

neuroblastoma, supressão de tumorigenicidade 1; proteína 2 de ligação de fator de crescimento semelhante a insulina, 36 kDa; cDNA FLJ12280 fis de *Homo sapiens*, clone MAMMAI 001744; fator 1 semelhante ao receptor de citocina; canal ativado por cálcio de condutância pequena/intermediário de potássio, subfamília N, membro 4; integrina, beta 7; coativador transcricional com motivo de ligação de PDZ (TAZ); homólogo 2 de homeobox de sine oculis (*Drosophila*); proteína KIAA 034; proteína 5 de membrana associada a vesícula (miobrevina); proteína 1 de matriz extracelular semelhante a fibulina contendo EGF; resposta 3 de crescimento precoce; homeo box 5 menos distal; proteína hipotética FLJ20373; família 1 de aldo-ceto reductase, membro C3 (3-alfa hidroxisteroide deidrogenase, tipo II); biglican; co-ativador transcricional com motivo de ligação de PDZ (TAZ); fibronectina 1; proencefalina; integrina, beta-tipo 1 (com domínios de repetição semelhante a EGF); clone EUROIMAGE 1968422 de cDNA de inserção de tamanho natural de mRNA de *Homo sapiens*; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C de peptídeo natriurético/ciclase C de guanilato (receptor C de peptídeo atrionatriurético); proteína FLJ 14054 hipotética; mRNA de *Homo sapiens*; cDNA DKFZp564B222 (de clone DKFZp564B222); tipo proteína 3 de interação com BCL2/adenovírus EIB 19 kDa; proteína 1 de ligação de AE; e polipeptídeo 1 de Vila de subunidade de oxidase de citocroma c (músculo).

[00076] Em outras modalidades, o UTC pode ser caracterizado por secreção de pelo menos um dentre: MCP-I; IL-6; IL-8; GCP-2; HGF; KGF; FGF; HB-EGF; BDNF; TPO; MIPIb; I309; MDC; RANTES; e TIMPI. Em algumas modalidades, o UTC pode ser caracterizado por falta de secreção de pelo menos um dentre: TGF-beta2; ANG2; PDGFbb; MIPIa; e VEGF, como detectado por ELISA.

[00077] Em algumas modalidades preferidas, o UTC é derivado de tecido de cordão umbilical substancialmente livre de sangue, são

capazes de autorrenovação e expansão em cultura, requer L-valina para o crescimento, pode crescer em pelo menos cerca de 5% de oxigênio, e compreende pelo menos uma das seguintes características: (1) o potencial para pelo menos cerca de 40 duplicações em cultura; (2) a capacidade de se prender e se expandir em um vaso de cultura de tecido não revestido ou um revestido com gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina, ou fibronectina; (3) produção de vimentina e alfa-actina de músculo liso; (4) produção de CD10, CD13, CD44, CD73, e CD90; e (5) expressão de um gene, que relativo a uma célula humana que é um fibroblasto, uma célula-tronco mesenquimal, ou uma célula da medula óssea da crista ilíaca, é aumentado para um gene codificando interleucina 8 e reticulon 1. Em algumas modalidades, tal UTC não produz CD45 e CD117.

[00078] O UTC descrito acima pode ser utilizado em métodos para tratar um paciente tendo doença vascular periférica, pode ser utilizado em composições farmacêuticas para tratar doença vascular periférica, por exemplo, em que tais composições compreendem as células tendo estas características e um veículo farmacêuticamente aceitável, e pode ser utilizado em kits para a fabricação, uso e prática de tais métodos e composições farmacêuticas como descrito e exemplificado aqui. Além disso, o UTC como descrito acima pode ser utilizado para gerar meios de cultura de célula condicionados ou para fazer preparações tais como extratos de célula e frações subcelulares que podem ser utilizadas para fabricar, utilizar, e praticar tais métodos e composições farmacêuticas como descrito e exemplificado aqui.

[00079] Em modalidades preferidas, a célula compreende dois ou mais do crescimento listado acima, produção de marcador de proteína/superfície, expressão de gene ou características de secreção de substância. Mais preferida é uma célula compreendendo, três, quatro, cinco ou mais das características. Ainda mais preferidos são

UTC compreendendo seis, sete, oito ou mais das características. Atualmente ainda mais preferido é uma célula compreendendo todas as características acima.

[00080] Entre as células que são atualmente preferidas para uso com a invenção em vários de seus aspectos são UTC tendo as características descritas acima, e mais particularmente, aqueles em que as células têm cariótipos normais e mantêm cariótipos normais com a passagem, e também em que as células expressam cada dos marcadores CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, e HLA-A,B,C, e em que as células produzem proteínas imunologicamente detectáveis que correspondem aos marcadores listados. Ainda mais preferidas são aquelas células que, além do anterior, não produzem proteínas que correspondem a quaisquer dos marcadores CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, ou HLA-DR,DP,DQ, como detectado por citometria de fluxo.

[00081] Certas células tendo o potencial de diferenciar ao longo das linhas levando a vários fenótipos são instáveis e desse modo podem espontaneamente diferenciar. Presentemente preferidas para uso com a invenção são as células que não espontaneamente diferenciam, por exemplo, ao longo das linhagens de mioblasto, músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito, hemangiogênico, angiogênica, vasculogênica, ou endotelial vascular. As células preferidas, quando crescidas em meio de crescimento, são substancialmente estáveis com respeito aos marcadores de célula produzidos em sua superfície, e com respeito ao padrão de expressão de vários genes, por exemplo, como determinado utilizando um teste de diagnóstico médico vendido sob o nome comercial GENECHIP (Affymetrix, Inc., Santa Clara, Calif). As células continuam substancialmente constantes, por exemplo, em suas características de marcador de superfície sobre a passagem e através de múltiplas duplicações de população.

[00082] Outro aspecto da invenção caracteriza o uso de populações

de um UTC descrito acima. Em algumas modalidades, a população de célula pode ser heterogênea. Uma população de célula heterogênea da invenção pode compreender pelo menos cerca de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 95% de UTC da invenção. As populações de célula heterogêneas da invenção podem também compreender células-tronco ou outras células progenitoras, tais como mioblastos ou outras células progenitoras do músculo, hemangioblastos, ou células precursoras do vaso sanguíneo; ou pode também compreender células do músculo esquelético completamente diferenciadas, células do músculo liso, pericito, ou células endoteliais do vaso sanguíneo. Em algumas modalidades, a população é substancialmente homogênea, isto é, compreende substancialmente somente o UTC (preferivelmente pelo menos cerca de 96%, 97%, 98%, 99% ou mais UTC). A população de célula homogênea da invenção pode compreender células derivadas do umbigo. As populações homogêneas de células derivadas do umbigo são preferivelmente livres de células de linhagem maternal. A homogeneidade de uma população de célula pode ser obtida por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, por classificação de célula (por exemplo, citometria de fluxo) ou por expansão clonal de acordo com métodos conhecidos. Desse modo, as populações de UTC homogêneas preferidas podem compreender uma linhagem celular clonal de células derivadas de pós-parto. Tais populações são particularmente úteis quando um clone de célula com funcionalidade altamente desejável foi isolado.

[00083] Também fornecido aqui é o uso de populações de células incubadas na presença de um ou mais fatores, ou sob condições, que estimulam a diferenciação de célula-tronco ao longo de uma série de reações de músculo liso vascular, endotelial vascular, ou pericito. Tais fatores são conhecidos na técnica e o técnico versado apreciará que a determinação de condições adequadas para diferenciação pode ser

realizada com experimentação de rotina. A otimização de tais condições pode ser realizada por análise e desígnios experimentais estatísticos, por exemplo, metodologia de superfície de resposta permite a otimização simultânea de múltiplas variáveis em uma cultura biológica. Os fatores atualmente preferidos incluem, porém não estão limitados a, fatores de crescimento ou tróficos, quimiocinas, citocinas, produtos celulares, agentes de desmetilação, e outros estímulos que são agora conhecidos ou mais tarde determinados para estimular a diferenciação, por exemplo, de células-tronco ao longo de linhagens ou série de reações de células-tronco ao longo de linhagens ou série de reações angiogênicas, hemangiogênicas, vasculogênica, músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito, ou endotelial vascular.

[00084] O UTC pode também ser geneticamente modificado para produzir produtos de gene terapeuticamente úteis, para produzir agentes angiogênicos para facilitar ou suportar o crescimento ou a formação de vaso sanguíneo adicional, ou para produzir fatores para recrutar células progenitoras endoteliais para a área de dano pulmonar. As células progenitoras endoteliais facilitam vasculogênese e fluxo sanguíneo, particularmente em seguida a um evento isquêmico. (Urbich C e Dimmeler S, *Circ. Res.*, 2004; 95:343-53). Os fatores que desempenham um papel no recrutamento de célula endotelial incluem, porém não estão limitados a, VEGF, fator-1 derivado estromal (SDF-I), eritropoietina (EPO), G-CSF, estatinas, estrogênio, PPAR- γ , CXCR4, FGF, e HGF. A modificação genética pode ser realizada utilizando qualquer de uma variedade de vetores incluindo, porém não limitado a, vetores virais integrantes, por exemplo, vetor de retrovírus ou vetores virais adeno-associados; vetores de replicação de não interação, por exemplo, vetores de vírus de papiloma, vetores de SV40, vetores adenovirais; ou vetores virais de replicação defeituosa. Outros métodos de introduzir DNA em células incluem o uso de lipossomas,

eletroporação, uma pistola de partícula, ou por injeção de DNA direta.

[00085] As células hospedeiras são preferivelmente transformadas ou transfectadas com DNA controlado por, ou em associação operatória com, um ou mais elementos de controle de expressão apropriados tais como sequências promotoras ou realçadoras, terminadores de transcrição, sítios de poliadenilação, entre outros, e um marcador selecionável. Qualquer promotor pode ser utilizado para direcionar a expressão do gene inserido. Por exemplo, os promotores virais incluem, porém não estão limitados ao promotor/realçador de CMV, SV 40, papilomavírus, vírus de Epstein-Barr ou promotor de gene de elastina. Em algumas modalidades, os elementos de controle utilizados para controlar a expressão do gene de interesse podem permitir a expressão regulada do gene de modo que o produto seja sintetizado somente quando necessário *in vivo*. Se a expressão transitória for desejada, promotores constitutivos são preferivelmente utilizados em um vetor de não integração e/ou de replicação defeituosa. Alternativamente, os promotores induzíveis podem ser utilizados para direcionar a expressão do gene inserido quando necessário. Os promotores induzíveis incluem, porém não estão limitados àqueles associados com metalotioneína e proteínas de choque térmico.

[00086] Em seguida a introdução do DNA estrangeiro, as células construídas podem ser permitidas crescer em meios enriquecidos e em seguida comutados para meios seletivos. O marcador selecionável no DNA estrangeiro confere resistência à seleção e permite que as células estavelmente integrem o DNA estrangeiro como, por exemplo, em um plasmídeo, em seus cromossomos e crescem para formar focos que, sucessivamente, podem ser clonados e expandidos em linhagens celulares. Este método pode ser vantajosamente utilizado para construir linhagens celulares que expressam o produto de gene.

[00087] As células da invenção podem ser geneticamente

construídas para expressão de "nocaute" ou "redução" de fatores que promovem a inflamação ou rejeição no sítio do implante. Técnicas moduladoras negativas para a redução de níveis de expressão de gene-alvo ou níveis de atividade de produto de gene-alvo são descritas abaixo. "Modulação negativa", como utilizado aqui, refere-se a uma redução no nível e/ou atividade de produto de gene-alvo relativo ao nível e/ou atividade do produto de gene-alvo na ausência do tratamento modulador. A expressão de um gene nativo para uma célula do músculo esquelético, célula de músculo liso vascular, pericito, célula endotelial vascular, ou células progenitoras dos mesmos pode ser reduzida ou nocauteada utilizando várias técnicas incluindo, por exemplo, inibição de expressão inativando-se o gene utilizando a técnica de recombinação de homólogo. Tipicamente, um exon codificando uma região importante da proteína (ou um exon 5' para aquela região) é interrompido por um marcador selecionável positivo, por exemplo, neo, prevenindo a produção de mRNA normal do gene-alvo e resultando na inativação do gene. Um gene pode também ser inativo criando-se uma deleção em parte de um gene, ou por deleção do gene total. Ao utilizar uma construção com duas regiões de homologia para o gene-alvo que estão distantes no genoma, as sequências que intervêm as duas regiões podem ser deletadas. (Mombaerts e outros, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1991; 88:3084-87). Antissenso, DNAzimas, ribozimas, RNA de interferência pequena (siRNA) e outras tais moléculas que inibem a expressão do gene-alvo podem também ser utilizadas para reduzir o nível de atividade de gene-alvo. Por exemplo, as moléculas de RNA de antissenso que inibem a expressão de complexos de gene de histocompatibilidade principal (HLA) foram mostradas serem mais versáteis com respeito às respostas imunes. Entretanto, além disso, as moléculas de hélice tripla podem ser utilizadas na redução do nível de atividade de gene-alvo.

[00088] Em outros aspectos, a invenção utiliza lisados celulares e frações solúveis em célula preparadas de um UTC, ou populações de célula heterogêneas ou homogêneas compreendendo um UTC, bem como um UTC ou populações dos mesmos que foram geneticamente modificadas ou que foram estimuladas para se diferenciar ao longo de uma série de reações de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito, ou endotélio vascular. Tais lisados e frações dos mesmos têm muitas utilidades. O uso da fração solúvel de lisado de UTC (isto é, substancialmente livre de membranas) *in vivo*, por exemplo, permite que o ambiente intracelular benéfico seja utilizado alogeneicamente em um paciente sem introduzir uma quantidade apreciável das proteínas de superfície de célula mais provavelmente para ativar a rejeição, ou outras respostas imunológicas adversas. Os métodos de lisar células são bem-conhecidos na técnica e incluem vários meios de rompimento mecânico, rompimento enzimático, ou rompimento químico, ou combinações dos mesmos. Tais lisados de célula podem ser preparados de células diretamente em seu meio de crescimento, e desse modo contêm fatores de crescimento secretados e similares, ou eles podem ser preparados de células lavadas livres do meio em, por exemplo, PBS ou outra solução. As células lavadas podem ser ressuspensas em concentrações maiores do que a densidade de população original se preferido.

[00089] Em uma modalidade, os lisados de célula inteira são preparados, por exemplo, rompendo-se as células sem separação subsequente de frações de célula. Em outra modalidade, uma fração de membrana de célula é separada de uma fração solúvel das células por métodos de rotina conhecidos na técnica, por exemplo, centrifugação, filtração, ou métodos similares.

[00090] Os lisados de célula ou frações solúveis em célula preparados de populações de células derivadas de pós-parto podem ser

utilizados no estado em que se encontram, também concentrados por, por exemplo, ultrafiltração ou liofilização, ou ainda secos, parcialmente purificados, combinados com diluentes ou veículos farmacologicamente aceitáveis como são conhecidos na técnica, ou combinados com outros compostos tais como biológicos, por exemplo, composições de proteína farmacologicamente úteis. Os lisados de célula ou frações dos mesmos podem ser utilizados *in vitro* ou *in vivo*, sozinho ou, por exemplo, com células vivas autólogas ou singeneicas. Os lisados, se introduzidos *in vivo*, podem ser introduzidos localmente em um sítio de tratamento, ou remotamente para fornecer, por exemplo, fatores de crescimento celular necessários a um paciente.

[00091] Em uma outra modalidade, o UTC pode ser cultivado *in vitro* para produzir produtos biológicos em alta produção. Um UTC que naturalmente produz um produto biológico particular de interesse (por exemplo, um fator trófico), ou que foi geneticamente construído para produzir um produto biológico, pode ser clonalmente expandido utilizando as técnicas de cultura descritas aqui. Alternativamente, as células podem ser expandidas em um meio que induz a diferenciação para uma linhagem do músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito, ou linhagem endotelial vascular. Em cada caso, os produtos biológicos produzidos pela célula e secretados no meio podem ser facilmente isolados do meio condicionado utilizando técnicas de separação padrão, por exemplo, tal como precipitação de proteína diferencial, cromatografia de permuta de íon, cromatografia de filtração de gel, eletroforese, e HPLC, para designar alguns. Um "biorreator" pode ser utilizado para tomar vantagem do método de fluxo para alimentar, por exemplo, uma cultura tridimensional *in vitro*. Essencialmente, quando meios frescos são passados através da cultura tridimensional, o produto biológico é lavado da cultura e pode em seguida ser isolado do escoamento, como acima.

[00092] Alternativamente, um produto biológico de interesse pode permanecer na célula e, desse modo, sua coleção pode requerer que as células sejam lisadas, como descrito acima. O produto biológico pode em seguida ser purificado utilizando qualquer uma ou mais das técnicas listadas acima.

[00093] Em outras modalidades, a invenção utiliza meio condicionado de UTC cultivado para uso *in vitro* e *in vivo* como descrito abaixo. O uso do meio condicionado de UTC permite que os fatores tróficos benéficos secretados pelo UTC sejam utilizados alogeneicamente em um paciente sem introduzir células intactas que poderiam ativar rejeição, ou outras respostas imunológicas adversas. O meio condicionado é preparado por cultura de células em um meio de cultura, em seguida removendo as células do meio.

[00094] O meio condicionado preparado de populações de células derivadas do cordão umbilical pode ser utilizado no estado em que se encontra, também concentrado, por exemplo, por ultrafiltração ou liofilização, ou ainda seco, parcialmente purificado, combinado com veículos ou diluentes farmacologicamente aceitáveis como são conhecidos na técnica, ou combinados com outros compostos tais como biológicos, por exemplo, composições de proteína farmacologicamente úteis. O meio condicionado pode ser utilizado *in vitro* ou *in vivo*, sozinho ou combinado com células vivas autólogas ou singeneicas, por exemplo. O meio condicionado, se introduzido *in vivo*, pode ser introduzido localmente em um sítio de tratamento, ou remotamente para fornecer fatores tróficos ou de crescimento celular necessários a um paciente.

[00095] Em outra modalidade, uma matriz extracelular (ECM) produzida por cultivo do UTC em substratos líquidos, sólidos ou semissólidos é preparada, coletada e utilizada como uma alternativa para implantar células vivas em um indivíduo em necessidade de reparo

ou substituição de tecido. O UTC é cultivado *in vitro*, em uma estrutura tridimensional como descrito em qualquer lugar aqui, sob condições tal que uma quantidade desejada de ECM seja secretada na estrutura. As células compreendendo o novo tecido são removidas, e o ECM processado para uso adicional, por exemplo, como uma preparação injetável. Para realizar isto, as células na estrutura são mortas e qualquer resíduo celular é removido da estrutura. Este processo pode ser realizado de vários modos diferentes. Por exemplo, o tecido vivo pode ser congelado instantaneamente em nitrogênio líquido sem um crioprotetor, ou o tecido pode ser imerso em água destilada estéril de modo que as células estourem em resposta a pressão osmótica.

[00096] Uma vez que as células foram mortas, as membranas celulares podem ser rompidas e os resíduos celulares removidos por tratamento com um enxágue detergente suave, tal como EDTA, CHAPS ou um agente zwitteriônico. Alternativamente, o tecido pode ser enzimaticamente digerido e/ou extraído com reagentes que quebram as membranas celulares e permite a remoção de teores de célula. Os exemplos de tais enzimas incluem, porém não estão limitados a, hialuronidase, dispase, proteases, e nucleases. Os exemplos de detergentes incluem detergentes não iônicos tais como, por exemplo, álcool de poliéter de alquilarila (TRITON X-100), octilfenóxi polietóxi- etanol (Rohm e Haas, Filadélfia, Pa.), BRIJ-35, um éter de laurila de polietoxietanol (Atlas Chemical Co., San Diego, Calif), polissorbato 20 (TWEEN 20), um monolaurato de sorbitan de polietoxietanol (Rohm e Haas, Filadélfia, Pa.), éter de laurila de polietileno (Rohm e Haas, Filadélfia, Pa.); e detergentes iônicos tais como sulfato de dodecila de sódio, alcoóis alifáticos superiores sulfatados, alcanos sulfonados e alquilarenos sulfonados contendo 7 a 22 átomos de carbono em uma cadeia ramificada ou não ramificada.

[00097] A coleção do ECM pode ser realizada em uma variedade de

modos, dependendo pelo menos em parte se o novo tecido foi formado em uma estrutura tridimensional que é biodegradável ou não biodegradável, como no caso de metais. Por exemplo, se a estrutura for não biodegradável, o ECM pode ser removido submetendo-se a estrutura a sonicação, jatos de água de alta pressão, raspagem mecânica, ou tratamento suave com detergentes ou enzimas, ou qualquer combinação dos acima.

[00098] Se a estrutura for biodegradável, o ECM pode ser coletado, por exemplo, permitindo-se a estrutura degradar ou dissolver na solução. Alternativamente, se a estrutura biodegradável for composta de um material que possa sozinho ser injetado junto com o ECM, a estrutura e o ECM podem ser processados em total para injeção subsequente. Alternativamente, o ECM pode ser removido da estrutura biodegradável por quaisquer dos métodos descritos acima para coleção de ECM de uma estrutura não biodegradável. Todos os processos de coleção são preferivelmente designados de modo a não desnaturar o ECM.

[00099] Após ter sido coletado, o ECM pode ser processado também. Por exemplo, o ECM pode ser homogeneizado para partículas finas utilizando técnicas bem conhecidas na técnica tais como por sonicação, de modo que possa passar através de uma agulha cirúrgica. Os componentes do ECM podem também ser reticulados, se desejado, por irradiação gama. Preferivelmente, o ECM pode ser irradiado entre 0,25 a 2 mega rads para esterilizar e reticular o ECM. A reticulação química utilizando agentes que sejam tóxicos, tal como glutaraldeído, é possível, porém não geralmente preferido.

[000100] As quantidades e/ou relações de proteínas, tais como vários tipos de colágeno presente no ECM, podem ser ajustadas misturando-se o ECM produzido pelas células da invenção com ECM de um ou mais outros tipos de células. Além disso, as substâncias biologicamente

ativas tais como proteínas, fatores de crescimento e/ou fármacos, podem ser incorporadas no ECM. As substâncias biologicamente ativas exemplares incluem fatores de crescimento de tecido, tal como TGF-beta, e similares, que promovem cura e reparo de tecido no sítio da injeção. Tais agentes adicionais podem ser utilizados em quaisquer das modalidades descritas aqui acima, por exemplo, com lisados de célula total, frações de célula solúveis, ou outros componentes purificados e produtos produzidos pelo UTC.

[000101] Em outro aspecto, a invenção fornece composições farmacêuticas que utilizam o UTC, populações de UTC, componentes e produtos do UTC em vários métodos para o tratamento de lesão ou dano causado por um episódio isquêmico periférico. Certas modalidades abrangem composições farmacêuticas compreendendo células vivas (UTC sozinho ou misturado com outros tipos de células). Outras modalidades abrangem composições farmacêuticas compreendendo componentes celulares de UTC (por exemplo, lisados de célula, frações de célula solúveis, meio condicionado, ECM, ou componentes de quaisquer dos anteriores) ou produtos (por exemplo, fatores tróficos e outros fatores biológicos produzidos naturalmente pelo UTC ou através de modificação genética, meio condicionado de cultura de UTC). Os componentes de UTC e produtos que podem ser utilizados na presente invenção são descritos nas Publicações de Patente U.S. N^{os} 2005/0032209, 2005/0058631 e 2005/0054098, e estão incorporados aqui por referência. Em outros casos, a composição farmacêutica pode também compreender outros ingredientes ativos, tais como agentes anti-inflamatórios, agentes antiapoptóticos, antioxidantes, fatores de crescimento, fatores miotróficos ou fármacos miorregenerativos ou mioprotetores como conhecido na técnica.

[000102] As composições farmacêuticas compreendendo células vivas de UTC são tipicamente formuladas como composições líquidas,

semissólidas (por exemplo, géis) ou sólidas (por exemplo, matrizes, armações e similares, como apropriado para construção de tecido vascular ou pulmonar). As composições líquidas são formuladas para administração por qualquer rotina aceitável conhecida na técnica para obter liberação de células vivas para os tecidos vasculares ou pulmonares alvos. Tipicamente, estes incluem injeção ou infusão, de um modo difuso, ou alvejado para o sítio de lesão, dano, ou angústia pulmonar, por uma rotina de administração incluindo, porém não limitado a, liberação intramuscular, intravenosa, ou intra-arterial através de uma seringa com agulhas e/ou cateteres com ou sem dispositivos de bomba.

[000103] As composições farmacêuticas compreendendo células vivas em um veículo semissólido ou sólido são tipicamente formuladas para implante cirúrgico no sítio da lesão, dano, ou angústia pulmonar. Será apreciado que composições líquidas também possam ser administradas por procedimentos cirúrgicos. Em modalidades particulares, composições farmacêuticas semissólidas ou sólidas podem compreender géis semipermeáveis, treliças, armações celulares e similares, que podem ser não biodegradáveis ou biodegradáveis. Por exemplo, em certas modalidades, pode ser desejável ou apropriado sequestrar as células exógenas de seus entornos, para ainda permitir que as células secretem e liberem moléculas biológicas (por exemplo, fatores miotróficos, fatores angiотróficos, ou fatores de recrutamento de célula progenitora endotelial) para cercar as células do tecido pulmonar ou vascular. Nestas modalidades, as células podem ser formuladas como implantes autônomos compreendendo uma população de célula ou UTC vivo compreendendo um UTC cercado por uma barreira não degradável, seletivamente permeável que fisicamente separa as células transplantadas do tecido hospedeiro. Tais implantes são algumas vezes referidos como "imunoprotetores", uma vez que eles têm a capacidade

de prevenir células e macromoléculas imunes de matarem as células transplantadas na ausência de imunossupressão farmacologicamente induzida.

[000104] Em outras modalidades, diferentes variedades de géis e redes degradáveis são utilizadas para uma composição farmacêutica da invenção. Por exemplo, os materiais degradáveis particularmente adequados para formulações de liberação prolongada incluem polímeros biocompatíveis, tais como ácido poli(láctico), poli (ácido láctico ácido-coglicólico), metilcelulose, ácido hialurônico, colágeno e similares.

[000105] Em outras modalidades, pode ser desejável ou apropriado liberar as células sobre ou dentro de uma armação ou matriz biodegradável, preferivelmente biorreabsorvível ou bioabsorvível. Estes, biomateriais tipicamente tridimensionais, contêm as células vivas presas à armação, dispersas na armação, ou incorporadas em uma matriz extracelular capturada na armação. Uma vez implantados na região-alvo do corpo, estes implantes ficam integrados com o tecido hospedeiro, em que as células transplantadas gradualmente ficam estabelecidas. (Vide, por exemplo, Tresco, P A, e outros., Adv. Drug Delivery Rev., 2000; 42:3-27; veja, também, Hutmacher, D W, J. Biomater. Sci. Polímero Edn., 2001; 12:107-174).

[000106] A matriz biocompatível pode ser compreendida de polímeros biodegradáveis naturais, naturais modificados ou sintéticos, incluindo homopolímeros, copolímeros e polímeros de bloco, bem como combinações dos mesmos. É notado que um polímero é geralmente nomeado com base no monômero do qual é sintetizado.

[000107] Os exemplos de polímeros biodegradáveis ou classes de polímero adequadas incluem fibrina, colágeno, elastina, gelatina, vitronectina, fibronectina, laminina, trombina, poli(aminoácido), celulose oxidada, tropoelastina, seda, ácidos ribonucleicos, ácidos

deoxirribonucleicos, proteínas, polinucleotídeos, matrizes de membrana de base reconstituída, amidos, dextranas, alginatos, hialuronato, quitina, quitosana, agarose, polissacarídeos, ácido hialurônico, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), polietileno glicol, tecido descelularizado, peptídeos de automontagem, polipeptídeos, glicosaminoglicanos, seus derivados e misturas dos mesmos. Tanto para ácido glicólico quanto para ácido láctico, um dímero cíclico intermediário é tipicamente preparado e purificado antes da polimerização. Estes dímeros intermediários são chamados glicolida e lactida, respectivamente. Outros polímeros biodegradáveis ou classes de polímero úteis incluem, sem limitação, poliésteres alifáticos, oxalatos de poli(alquileno), policarbonatos derivados de tirosina, poliiminocarbonatos, poliortoésteres, polioxaésteres, poliamidoésteres, polioxaésteres contendo grupos amina, poli(fumarato de propileno), polidioxanonas, policarbonatos, polioxalatos, poli(alfa-hidoxiácidos), poli(ésteres), poliuretano, éster de poli(uretano), éter de poli(uretano), polianidretos, poliacetatos, policaprolactonas, poli(ortoésteres), poliaminoácidos, poliamidas e misturas e copolímeros dos mesmos. Os polímeros biodegradáveis úteis adicionais incluem, sem limitação, estereopolímeros de ácido L- e D-láctico, copolímeros de bis(para-carboxifenóxi) propano e ácido sebácico, copolímeros de ácido sebácico, copolímeros de caprolactona, copolímeros de ácido poli(láctico)/ácido poli(glicólico)/polietilenoglicol, copolímeros de poliuretano e copolímeros de ácido poli(láctico), de alfa-aminoácidos, copolímeros de alfa-aminoácidos e ácido caproico, copolímeros de glutamato de alfa-benzila e polietileno glicol, copolímeros de succinato e poli(glicóis), polifosfazeno, poli(hidroxialcanoatos) e mistura dos mesmos. Os sistemas binário e ternário também são contemplados.

[000108] Em geral, um polímero biodegradável adequado para uso como a matriz é desejavelmente configurado de modo que: (1) tenha

propriedades mecânicas que sejam adequadas para a pretendida aplicação; (2) permaneça suficientemente intacto até que o tecido tenha crescido e curado; (3) não invoque resposta inflamatória ou tóxica; (4) seja metabolizada no corpo após cumprir sua finalidade; (5) seja facilmente processado no produto final desejado a ser formado; (6) demonstre a meia-vida aceitável; e (7) seja facilmente esterilizado.

[000109] Em um aspecto da invenção, o polímero biocompatível utilizado para formar a matriz está na forma de um hidrogel. Em geral, os hidrogéis são materiais poliméricos reticulados que podem absorver mais do que 20% de seu peso em água ao mesmo tempo em que mantendo uma estrutura tridimensional distinta. Esta definição inclui polímeros reticulados secos que dilatarão em ambientes aquosos, bem como materiais dilatáveis em água. Um hospedeiro de polímeros hidrofílicos pode ser reticulado para produzir hidrogéis, quer o polímero seja de origem biológica, semissintética, ou totalmente sintética. O hidrogel pode ser produzido de um material polimérico sintético. Tais polímeros sintéticos podem ser adaptados a uma faixa de propriedades e uniformidade de lote para lote previsível, e representa uma fonte confiável de material que geralmente é livre de questões de imunogenicidade. As matrizes podem incluir hidrogéis formados de peptídeo de automontagem, tais como aqueles descritos nas Patentes dos Estados Unidos N^{os} 5.670.483 e 5.955.343, Pedido de Patente dos Estados Unidos N^o 2002/0160471, e Pedido PCT N^o WO 02/062969.

[000110] As propriedades que tornam os hidrogéis valiosos em aplicações de liberação de fármaco incluem o grau de dilatação de equilíbrio, cinéticos de absorção, permeabilidade de soluto, e suas características de desempenho *in vivo*. A permeabilidade aos compostos depende em parte do grau de dilatação ou teor de água e da taxa de biodegradação. Uma vez que a força mecânica de um gel declina na proporção da direção para o grau de dilatação, está também

dentro da contemplação da presente invenção que o hidrogel pode ser preso a um substrato de modo que o sistema de compósito realce a força mecânica. Em algumas modalidades, o hidrogel pode ser impregnado em um substrato poroso, de modo que ganhe a força mecânica do substrato, junto com as propriedades de liberação úteis do hidrogel.

[000111] Os exemplos não limitantes de armação ou matriz (algumas vezes referido coletivamente como "estrutura") que pode ser utilizada na presente invenção incluem estruturas têxteis tais como tecelagens, malhas, tranças, não trançados, e malhas deformadas; espumas porosas, espumas semiporosas, películas ou folhas perfuradas, micropartículas, contas, e esferas e estruturas de compósito sendo uma combinação das estruturas acima. As mantas não trançadas podem, por exemplo, ser formadas utilizando fibras compreendidas de um copolímero absorvível sintético de ácidos glicólicos e lácticos (PGA/PLA), vendidos sob o nome comercial suturas de VICRYL (Ethicon, Inc., Somerville, N.J.). As espumas, compostas de, por exemplo, copolímero de poli(epsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), formado por processos tais como secagem por congelamento, ou liofilização, como descrito na Patente dos Estados Unidos Nº 6.355.699, também podem ser utilizados. Os hidrogéis tais como peptídeos de automontagem (por exemplo, RAD 16) também podem ser utilizados. As redes degradáveis de formação *in situ* são também adequadas para uso na invenção. (Vide, por exemplo, Anseth, K S e outros, J. Controlled Release, 2002; 78:199-209; Wang, D. e outros, Biomaterials, 2003; 24:3969-3980; Publicação de Patente dos Estados Unidos 2002/0022676). Estes materiais de formação *in situ* são formulados como fluidos adequados para injeção, em seguida podem ser induzidos a formar um hidrogel por uma variedade de meios tal como mudança na temperatura, pH, e exposição à luz *in situ* ou *in vivo*.

[000112] Em outra modalidade, a estrutura é um feltro, que pode ser composto de um fio de multifita feito de um material bioabsorvível, por exemplo, copolímeros ou misturas de PGA, PLA, PCL, ou ácido hialurônico. O fio é feito em um feltro utilizando técnicas de processamento de têxteis padrões consistindo em pregueação, corte, cardação e costura. Em outra modalidade, as células são semeadas em armações de espuma que podem ser estruturas de compósito.

[000113] Em muitas das modalidades mencionadas acima, a estrutura pode ser moldada em uma forma útil, tal como que de um vaso sanguíneo. Além disso, será apreciado que UTC possa ser cultivado em dispositivos implantáveis ou cirúrgicos não degradáveis, pré-formados, por exemplo, de uma maneira correspondendo àquela utilizada para preparar bobinas endovasculares de GDC contendo fibroblasto, por exemplo. (Marx, WF, e outros, Am. J. Neuroradiol, 2001; 22:323-333).

[000114] A matriz, armação ou dispositivo pode ser tratado antes da inoculação das células para realçar a ligação de célula. Por exemplo, antes da inoculação, as matrizes de náilon podem ser tratadas com 0,1 molar de ácido acético e incubadas em polilisina, PBS, e/ou colágeno para revestir o náilon. Poliestireno pode ser similarmente tratado utilizando ácido sulfúrico. As superfícies externas de uma estrutura podem também ser modificadas para melhorar a ligação e crescimento de células e diferenciação de tecido, tal como por revestimento plasmáticos da estrutura ou adição de uma ou mais proteínas (por exemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanas (por exemplo, sulfato de heparina, condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato, sulfato de dermatan, sulfato de queratina), os materiais genéticos tais como citocinas e fatores de crescimento, uma matriz celular, e/ou outros materiais, incluindo, porém não limitado a, gomas de gelatina, alginatos, ágar, agarose, e de planta, entre outros fatores afetando a diferenciação e sobrevivência de célula.

[000115] As estruturas contendo UTC são preparadas de acordo com métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, as células podem ser crescidas livremente em um vaso de cultura para subconfluência ou confluência, levantado da cultura e inoculado na estrutura. Os fatores de crescimento podem ser adicionados ao meio de cultura antes, durante ou subsequente à inoculação das células para ativar a diferenciação e formação de tecido, se desejado. Alternativamente, as estruturas sozinhas podem ser modificadas de modo que o crescimento das células desta seja realçado, ou de modo que o risco de rejeição do implante seja reduzido. Desse modo, um ou mais compostos biologicamente ativos, incluindo, porém não limitado a, compostos anti-inflamatórios, imunossupressores ou fatores de crescimento, podem ser adicionados à estrutura para liberação local.

[000116] Um UTC, partes de um UTC ou populações de célula compreendendo um UTC, ou componentes de ou produtos produzidos por um UTC, podem ser utilizados em uma variedade de modos para suportar e facilitar o reparo, regeneração, e melhora de células e tecidos pulmonares, para melhorar o fluxo sanguíneo, e estimular e/ou suportar angiogênese, especialmente em pacientes de doença pulmonar. Tais utilidades abrangem métodos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

[000117] Em uma modalidade, como descrito acima, o UTC pode ser cultivado *in vitro* para produzir produtos biológicos que são ou naturalmente produzidos pelas células, ou produzidos pelas células quando induzidos a diferenciação em tecido pulmonar, ou produzidos pelas células através de modificação genética. Por exemplo, descobriu-se que TIMPI, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIPIb, MCP1, RANTES, 1309, TARC, MDC, e IL-8 são secretados de células derivadas do umbigo crescidas em meio de crescimento. (Vide os Exemplos). Além disso, os fatores para recrutamento de célula progenitora endotelial tal como VEGF, SDF-I, EPO, G-CSF, estatinas,

estrogênio, PPAR- γ , e CXCR4 podem ser produzidos pelo UTC e podem ser secretados no meio de crescimento. Outros fatores tróficos, como ainda não detectado ou não examinado, de uso no reparo e regeneração do tecido pulmonar ou vascular, são prováveis de serem produzidos pelo UTC e possivelmente secretados no meio.

[000118] Neste respeito, outra modalidade da invenção caracteriza o uso do UTC para produção de meio condicionado, de um UTC não diferenciado ou de um UTC incubado sob condições que estimulam a diferenciação em uma linhagem de tecido pulmonar ou vascular. Tais meios condicionados são contemplados para uso em cultura *in vitro* ou *ex vivo* de células precursoras de tecido pulmonar, ou *in vivo* para suportar as células transplantadas compreendendo populações homogêneas de um UTC ou populações heterogêneas compreendendo um UTC e progenitores de tecido pulmonar ou vascular, ou para recrutar células progenitoras endoteliais para o sítio de lesão pulmonar, por exemplo.

[000119] Ainda outra modalidade compreende o uso de lisados de célula UTC, frações de célula solúveis ou componentes dos mesmos, ou ECM ou componentes dos mesmos, para uma variedade de propósitos. Como mencionado acima, alguns destes componentes podem ser utilizados em composições farmacêuticas. Em outras modalidades, um lisado de célula ou ECM é utilizado para revestir ou de outro modo tratar as substâncias ou dispositivos a serem utilizados cirurgicamente, ou para implantação, ou para propósitos *ex vivo*, para promover a cura ou sobrevivência de células ou tecidos contatados no curso de tais tratamentos. Em algumas modalidades preferidas, tais preparações feitas de um UTC compreendem FGF e HGF.

[000120] Em outra modalidade, um UTC é utilizado vantajosamente em coculturas *in vitro* para fornecer o suporte trófico para outras células, em particular, células do tecido pulmonar, por exemplo, células

progenitoras do músculo esquelético, células de músculo liso vascular, células progenitoras de músculo liso vascular, pericito, células endoteliais vasculares, ou células progenitoras de endotélio vascular. Em algumas modalidades preferidas, o suporte trófico é proliferação das células. Para cocultura, pode ser desejável para o UTC e as outras células desejadas serem cocultivados sob condições nas quais os dois tipos de célula estão em contato. Isto pode ser obtido, por exemplo, semeando-se as células como uma população heterogênea de células em meio de cultura ou sobre um substrato de cultura adequado. Alternativamente, o UTC pode primeiro ser crescido para confluência, e em seguida servirá como um substrato para o segundo tipo de célula desejado em cultura. Nesta última modalidade, as células podem também ser fisicamente separadas, por exemplo, por uma membrana ou dispositivo similar, tal que o outro tipo de célula possa ser removido e utilizado separadamente, em seguida ao período de cocultura. O uso do UTC em cocultura para promover expansão e diferenciação de tipos de célula de tecido pulmonar ou vascular pode encontrar aplicabilidade na pesquisa e em áreas clínicas/terapêuticas. Por exemplo, coculturas de UTC podem ser utilizadas para facilitar o crescimento e diferenciação de tecido pulmonar, por exemplo, músculo liso vascular, pericito, ou células endoteliais vasculares, em cultura, para propósitos de pesquisa básicos ou para uso em ensaios de avaliação de fármaco, por exemplo. As coculturas de UTC também podem ser utilizadas para expansão *ex vivo* de, por exemplo, progenitores de músculo liso vascular, pericito, ou endotélio vascular para administração posterior para propósitos terapêuticos. Tecido pulmonar, por exemplo, músculo liso vascular, pericito, ou células progenitoras de endotélio vascular, pode ser colhido de um paciente, expandido *ex vivo* em cocultura com UTC, em seguida retornado para aquele paciente (transferência autóloga) ou outro paciente (transferência singeneica ou alogeneica). Nestas modalidades,

será apreciado que, em seguida a expansão *ex vivo*, a população misturada de células compreendendo o UTC e tecido pulmonar, por exemplo, progenitores do músculo liso vascular, pericito, ou endotélio vascular, pode ser administrada a um paciente em necessidade do tratamento. Alternativamente, em situações onde a transferência autóloga é apropriada ou desejável, as populações de célula cocultivadas podem ser fisicamente separadas em cultura, permitindo a remoção do tecido pulmonar autólogo, por exemplo, progenitores do músculo liso vascular, ou endotélio vascular, para administração ao paciente.

[000121] Como descrito nas Publicações de Patente dos Estados Unidos N^{os} 2005/0032209, 2005/0058631, 2005/0054098 e 2005/0058630, UTC, e componentes e produtos dos mesmos, foram mostrados serem eficazmente transplantados no corpo, e para melhorar o fluxo sanguíneo e reduzir a necrose de tecido em um modelo animal aceito. Estas descobertas, junto com as descobertas apresentadas na presente invenção, suportam as modalidades preferidas da invenção, em que o UTC é utilizado em terapia de célula para tratar lesão ou dano pulmonar reparando-se ou regenerando-se o tecido pulmonar e/ou tecido vascular em um paciente de dano pulmonar, ou melhorando-se o fluxo sanguíneo ou estimulando-se e/ou suportando-se angiogênese em um paciente de dano pulmonar. Em uma modalidade, o UTC é transplantado em um local-alvo no corpo, especialmente em ou próximo do local do dano pulmonar, onde o UTC pode se diferenciar em um ou mais dos fenótipos de tecido pulmonar, por exemplo, fenótipos de músculo liso vascular, pericito, ou endotélio vascular, o UTC pode fornecer suporte trófico para tecido pulmonar, por exemplo, progenitores de célula de músculo liso vascular, pericito, ou célula endotelial vascular e/ou células do tecido pulmonar. *In situ*, o UTC pode produzir fatores para recrutar as células progenitoras endoteliais para o sítio da lesão

pulmonar, ou o UTC pode exercer um efeito benéfico em dois ou mais daqueles modos, entre outros. O UTC secreta fatores tróficos incluindo, porém não limitados a GFGFm, IL-6, IL-8, HGF, IGF-I, TPO, e similares. O UTC pode ajudar no recrutamento de células progenitoras vasculares tais como angioblastos para estimular nova formação de vaso sanguíneo.

[000122] O UTC pode exercer efeitos tróficos no corpo do paciente ao qual eles são administrados. Por exemplo, o UTC pode exercer efeitos tróficos em células do tecido pulmonar, por exemplo, células de músculo liso vascular, células endoteliais vasculares, pericito, ou células progenitoras, dos mesmos. Em algumas modalidades preferidas, o efeito trófico é a proliferação de tais células. O UTC pode também induzir migração de células no corpo do paciente ao qual elas são administradas. Tal migração pode facilitar o reparo, regeneração e tratamento de doenças, distúrbios, e/ou lesões pulmonares, tais como COPD, ALI, ARDS, e fibrose pulmonar. Por exemplo, um UTC administrado em ou próximo de um sítio de dano pulmonar pode induzir migração de células para o sítio de dano pulmonar para reparar, regenerar, ou de outro modo tratar o tecido doente e seus arredores. O UTC então administrado pode induzir migração de células do tecido pulmonar, por exemplo, células de músculo liso vascular, células endoteliais vasculares, pericito, ou células progenitoras, dos mesmos. Em modalidades preferidas, os UTC induzem migração de células endoteliais vasculares e/ou células progenitoras de endotélio vascular para o sítio, ou pelo menos próximo do sítio do dano pulmonar. Em algumas modalidades, a migração é induzida ou suportada por FGF e/ou HGF, preferivelmente FGF e HGF expresso pelo UTC. As preparações feitas do UTC, incluindo lisados de célula, frações subcelulares, produtos, e similares, também podem ser utilizadas para tratar doença, distúrbios e/ou lesões pulmonares. Tais preparações

podem ser formuladas com os veículos farmacologicamente aceitáveis tais como aqueles descritos e exemplificados aqui, e administrados aos pacientes em quantidades eficazes para tratar doença, distúrbios e/ou lesões pulmonares. Em modalidades preferidas, as preparações feitas do UTC compreendem FGF e HGF.

[000123] As modalidades da invenção específicas são direcionadas para reparo, regeneração e substituição direta de, ou o suporte do reparo, regeneração, ou substituição de vasos sanguíneos, para o tratamento de lesão ou dano pulmonar.

[000124] O UTC pode ser administrado sozinho (por exemplo, como populações substancialmente homogêneas) ou como misturas com outras células. Como descrito acima, o UTC pode ser administrado quando formulado em uma preparação farmacêutica com uma matriz ou armação, ou com veículo convencional farmacologicamente aceitável. Onde o UTC é administrado com outras células, elas podem ser administradas simultaneamente ou sequencialmente com as outras células (ou antes ou após as outras células). As células que podem ser administradas em conjunto com o UTC incluem, porém não estão limitados a, miócitos, células do tecido pulmonar, células progenitoras do músculo esquelético, células de músculo liso vascular, células progenitoras de músculo liso vascular, pericito, células endoteliais vasculares, ou células progenitoras de endotélio vascular, e/ou outras células-tronco multipotentes ou pluripotentes. As células de diferentes tipos podem ser misturadas com o UTC imediatamente ou logo antes da administração, ou elas podem ser cocultivadas juntas durante um período de tempo antes da administração.

[000125] O UTC pode ser administrado com outros fármacos benéficos ou moléculas biológicas, ou outros agentes ativos, tais como agentes anti-inflamatórios, agentes antiapoptóticos, antioxidantes, fatores de crescimento, fatores angiogênicos, ou fármacos

miorregenerativos ou mioprotetores como conhecido na técnica. Quando o UTC é administrado com outros agentes, eles podem se administrados juntos em uma única composição farmacêutica, ou em composições farmacêuticas separadas, simultaneamente ou sequencialmente com os outros agentes (ou antes ou após a administração dos outros agentes). Os outros agentes podem ser uma parte de um regime de tratamento que começa ou antes do transplante e continua durante todo o curso de recuperação, ou pode ser iniciado no momento do transplante, ou ainda após o transplante, como um médico versado na técnica considera apropriado.

[000126] Em uma modalidade, o UTC é administrado como células não diferenciadas, isto é, quando cultivadas em meio de crescimento. Alternativamente, o UTC pode ser administrado em seguida à exposição em cultura às condições que estimulam a diferenciação para um fenótipo de tecido pulmonar desejado, por exemplo, fenótipos do músculo liso vascular, pericito, ou endotélio vascular.

[000127] As células da invenção podem ser cirurgicamente implantadas, injetadas, liberadas (por exemplo, por modo de um cateter, seringa, desvio, stent, microcateter, ou bomba), ou de outro modo administradas diretamente ou indiretamente ao sítio da lesão, dano, ou angústia pulmonar. As rotinas de administração das células da invenção, ou composições da mesma, incluem, porém não estão limitados a, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intranasal, intratecal, intracisternal, ou através de seringas com agulhas ou cateteres com ou sem os dispositivos de bomba.

[000128] Quando as células são administradas em dispositivos semissólidos ou sólidos, o implante cirúrgico em um local preciso no corpo é tipicamente um meio adequado de administração. As composições farmacêuticas líquidas ou fluidas, entretanto, podem ser administradas através do sangue, ou diretamente no tecido pulmonar

afetado (por exemplo, em toda uma área difusamente afetada, tal como seria o caso para ALI ou ARDS difuso). A migração do UTC pode ser guiada por sinais químicos, fatores de crescimento, ou calpaínas.

[000129] As células derivadas de tecido de cordão umbilical, ou composições e/ou matrizes compreendendo as células derivadas de tecido de cordão umbilical, podem ser liberadas para o sítio através de um micro cateter, intracateterização, ou através de uma minibomba. O veículo, excipiente ou portador pode ser qualquer daqueles conhecidos por serem farmacologicamente aceitáveis para administração a um paciente, particularmente localmente no sítio no qual a diferenciação celular deve ser induzida. Os exemplos incluem meios líquidos, por exemplo, Meio de Eagle Modificado de Dulbeccos (DMEM), salina estéril, salina estéril tamponada de fosfato, meio de Leibovitz (L15, Invitrogen, Carlsbad, Calif), dextrose em água estéril, e qualquer outro líquido fisiologicamente aceitável.

[000130] Outras modalidades abrangem métodos de tratar lesão ou dano pulmonar administrando-se composições terapêuticas compreendendo um veículo farmacologicamente aceitável e componentes celulares de UTC (por exemplo, lisados de célula ou componentes dos mesmos) ou produtos (por exemplo, tróficos e outros fatores biológicos produzidos naturalmente pelo UTC ou através de modificação genética, meio condicionado de cultura de UTC), ou meio de crescimento de UTC ou produtos purificados de meio de crescimento. Em modalidades preferidas, os fatores biológicos são FGF e HGF. Estes métodos podem também compreender administrar outros agentes ativos, tais como fatores de crescimento, fatores angiogênicos ou fármacos mioregenerativos ou mioprotetores como conhecido na técnica.

[000131] Os regimes e formas de dosagem para administrar o UTC ou quaisquer das outras composições terapêuticas ou farmacêuticas como

descrito aqui são desenvolvidos de acordo com a boa prática médica, levando em consideração a condição do paciente individual, por exemplo, natureza e extensão da lesão ou dano do evento de danificação pulmonar, idade, sexo, peso corporal, e condição médica geral, e outros fatores conhecidos pelos médicos. Desse modo, a quantidade eficaz de uma composição farmacêutica a ser administrada a um paciente é determinada por estas considerações como conhecido na técnica.

[000132] O UTC foi mostrado estimular PBMCs alogeneicos em uma reação de linfócito misturada. Consequentemente, o transplante alogeneico, ou ainda xenogeneico, de UTC pode ser tolerado em alguns casos. Em algumas modalidades, o UTC sozinho fornece um efeito imunossupressor, desse modo prevenindo a rejeição do hospedeiro do UTC transplantado. Em tais casos, a imunossupressão farmacológica durante a terapia celular pode não ser necessária.

[000133] Entretanto, em outros casos pode ser desejável ou apropriado farmacologicamente imunossuprimir um paciente antes de iniciar a terapia celular. Isto pode ser realizado através do uso de agentes imunossupressores locais ou sistêmicos, ou pode ser realizado por liberação das células em um dispositivo encapsulado, como descrito acima. Estes e outros meios para reduzir ou eliminar uma resposta imune para as células transplantadas são conhecidos na técnica. Como uma alternativa, o UTC pode ser geneticamente modificado para reduzir sua imunogenicidade, como mencionado acima.

[000134] A sobrevivência do UTC transplantado em um paciente vivo pode ser determinada através do uso de uma variedade de técnicas de varredura, por exemplo, varredura de tomografia axial computadorizada (CAT ou CT), varreduras de imageamento de ressonância magnética (IRM) ou de tomografia por emissão de pósitrons (TEP). A determinação de sobrevivência de transplante pode também ser feita pós-morte

removendo-se o tecido pulmonar ou tecido vascular, e examinando-se visualmente ou através de um microscópio. Alternativamente, as células podem ser tratadas com manchas que são específicas para células do tecido pulmonar, por exemplo, células de músculo liso vascular, pericito, ou células endoteliais vasculares. As células transplantadas podem também ser identificadas pela incorporação anterior de tintas traçadoras tais como microesferas rotuladas por rodamina ou fluoresceína, azul resistente, micropartículas férricas, bisbenzamida ou produtos de gene repórter geneticamente introduzidos, tais como beta-galactosidase ou beta-glucuronidase.

[000135] Em outro aspecto, a invenção fornece kits que utilizam o UTC, populações de UTC, componentes e produtos do UTC em vários métodos para estimular e/ou suportar angiogênese, para melhorar o fluxo sanguíneo, para regenerar, reparar, e melhorar o tecido pulmonar lesionado ou danificado por um evento de danificação pulmonar, como descrito acima. Onde usado para tratamento de dano ou lesão causado por uma doença pulmonar, distúrbios e/ou lesões, ou outro tratamento planejado, os kits podem incluir uma ou mais populações de célula, incluindo pelo menos o UTC e um veículo farmacologicamente aceitável (líquido, semissólido ou sólido). Os kits também opcionalmente podem incluir um meio de administrar as células, por exemplo, por injeção. Os kits também podem incluir instruções para as células. Kits preparados para uso de hospital de campo, tal como para uso militar, podem incluir abastecimento para procedimento total incluindo armações de tecido, suturas cirúrgicas, e similares, onde as células devem ser utilizadas em conjunto com o reparo de lesões agudas. Kits para ensaios e métodos *in vitro* como descrito aqui podem conter um ou mais de (1) um UTC ou componentes ou produtos do UTC, (2) reagentes para praticar o método *in vitro*, (3) outras células ou populações de célula, quando apropriado, e (4) instruções para conduzir o método *in vitro*.

[000136] Os seguintes exemplos descrevem vários aspectos de modalidades da invenção em maiores detalhes. Estes exemplos são pretendidos também ilustrar os aspectos da invenção descrita aqui. Estes exemplos devem ser considerados para limitar o aspecto então exemplificado.

EXEMPLO 1

Eficácia Protetora Pulmonar em um Modelo de Camundongo de Lesão Pulmonar Aguda Induzida por Hiperóxia

[000137] Este exemplo ilustra a eficácia de UTC humano (hUTC) (isolamento e caracterização de hUTC podem ser encontrados nos Exemplos 5-15) para realçar o reparo e regeneração pulmonar em um modelo de lesão pulmonar induzida por hiperóxia.

Isolamento de Cultura de Célula Umbilical

[000138] As células derivadas do umbigo (UDC, hUTC) foram preparadas como descrito nas Publicações de Patente dos Estados Unidos N^{os} 2005/0032209, 2005/0058631 e 2005/0054098. As células foram cultivadas para a passagem desejada e em seguida criogenicamente conservadas.

Modelo Animal

[000139] Camundongos C57BL/6 fêmeas (sete semanas de idade) foram obtidos de Ace Animals (Boyertown, PA). Imediatamente antes da injeção, hUTC foram descongelados em 37°C (banho com água) e lavados duas vezes em salina tamponada de fosfato (PBS) e ressuspensos em 1 mL de PBS. As células foram contadas utilizando um hemocítômetro. A viabilidade celular foi determinada por exclusão de tinta azul tripano. As células foram reconstituídas em uma concentração de 1×10^6 células em 200 µl PBS.

[000140] O estudo descrito é resumido na Tabela 1-1 abaixo. No Dia 0, as células (1×10^6 hUTC em 200 µl de PBS) ou veículo de PBS foram lentamente administradas aos camundongos por injeção na veia

intravenosa utilizando uma seringa de 1 mL e uma agulha de 26-gauge e os animais foram em seguida expostos ao ar ambiente ou 90% de O₂. A exposição a 90% de O₂ foi realizada colocando-se os animais em uma câmara BioSpherix (BioSpherix, LTD, Lacona, NY) que foi iniciada e equilibrada para 90% de O₂ durante uma hora. O cuidado sustentador (suporte térmico e NutriCal) foi fornecido diariamente para estes animais. As observações do animal, mortalidade, sobrevivência, e porcentagem de concentrações de oxigênio para cada tanque foram registrados duas vezes por dia. No dia quatro pós-tratamento, os animais foram eutanizados utilizando 50 mg/mL de Nembutal (pentobarbital).

Tabela 1-1. Desígnio Experimental.

Grupo de tratamento	Tratamento atmosférico	Tratamento	Número de animais
1	Ar ambiente	PBS	12
2	90% de O ₂	PBS	12
3	90% de O ₂	1e ⁶ hUTC	12

Análise de Proteína Total por Fluido de Lavagem Broncoalveolar (BALF)

[000141] Para determinar a proteína total em cada amostra, BALF livre de célula foi analisado utilizando um Ensaio de Proteína BCA (Pierce). A análise foi completada utilizando o programa Softmax 4.0 e os dados foram representados graficamente utilizando Software Graph Pad Prism.

Análise de Citocinas/Quimiocina de Homogenato Pulmonar e BALF

[000142] Para preparar BALF, 6 animais por grupo de tratamento foram eutanizados e os pulmões foram lavados uma vez com 1,0 mL de PBS estéril (Invitrogen) e os tubos foram colocados em gelo úmido. O BALF foi centrifugado em 1000 rpm durante 5 min e o fluido sobrenadante foi removido e utilizado para outra análise.

[000143] Para preparar os homogenatos pulmonares, 6 animais por grupo foram eutanizados, submetidos a perfusão de corpo total com

PBS e os pulmões esquerdo foram dissecados e colocados em gelo em tubos Lysing Matrix D e em seguida centrifugados em um instrumento FastPrep em uma velocidade de 4,0 durante 40 segundos.

[000144] Os níveis de citocina/quimiocina em ambos sobrenadantes de BALF e homogenato pulmonar foram determinados utilizando um kit de 22 múltiplas contas de camundongo (Millipore) seguindo o protocolo do fabricante e analisados utilizando uma máquina de BioRad Bioplex. Os resultados foram representados graficamente e analisados utilizando Software GraphPad Prism.

Detecção de Célula Humana

[000145] O RNA total foi isolado de tecidos de camundongo por Asuragen, Inc., de acordo com os procedimentos operacionais padrões da companhia. A pureza e quantidade de amostras de RNA total foram determinadas por leituras de absorbância em 260 e 280 nm utilizando um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 UV. A integridade de RNA foi avaliada utilizando um Bioanalisador Agilent.

[000146] Os ensaios específicos para humano para mRNA de GAPDH (Hs99999905_m1_GAPDH) foram utilizados para estimar o número de hUTC em tecido pulmonar de camundongo. As amostras para análise de RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) utilizando Ensaios TaqMan® de tubo único (Applied Biosystems) foram processadas por Asuragen, Inc., de acordo com os procedimentos operacionais padrões da companhia. As diluições de RNA total foram transcritas reversas utilizando o Kit de Síntese de cDNA de Alta Capacidade TaqMan® (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante e em um volume de reação total de 20 microlitros por diluição. 50 ng de cDNA de influxo foi em seguida analisado por PCR. Todas as amplificações foram realizadas em triplicata em um termociclizador em tempo real ABI 7500 validado. Em seguida a incubação a 95°C durante 10 minutos, as amostras foram amplificadas em 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, em seguida

60°C durante 1 minuto. O número total de hUTC nos pulmões do camundongo foi estimado com base em uma curva padrão gerada analisando-se as quantidades conhecidas de RNA total de hUTC purificado.

Proteína Total de BALF

[000147] Exposição a 90% de O₂ durante 4 dias resultou em um aumento no teor de proteína total de BALF comparado com animais de controle de ar ambiente ($p < 0,01$, figura 1, Tabelas 1-2). Além disso, houve uma diminuição estatisticamente significativa na proteína de BALF total no grupo de tratamento hUTC de 90% de O₂ quando comparado como o grupo de tratamento de PBS de 90% O₂ ($p < 0,05$).

Tabelas 1-2. Concentração de proteína total BALF: Proteína total foi medida utilizando Ensaio de Proteína Pierce BCA.

Grupo de tratamento	Número de Animal	Concentração de Proteína BALF Total (ug/dl)
1	1	401,89
1	2	1006,68
1	3	660,67
1	4	494,49
1	5	1432,64
1	6	76,23
Média		678,77
Desvio padrão		437,77

Grupo de tratamento	Número de Animal	Concentração de Proteína BALF Total (ug/dl)
2	1	1701,60
2	2	1438,46
2	3	1197,13
2	4	2823,95
2	5	4482,76
2	6	3174,32

Média	2469,70
Desvio padrão	1260,74

Grupo de tratamento	Número de Animal	Concentração de Proteína BALF Total (ug/dl)
3	1	984,87
3	2	691,20
3	3	1172,41
3	4	893,28
3	5	695,56
3	6	1359,95
Média		966,21
Desvio padrão		265,37

Análise de Citocina de Homogenato de Pulmão de BALF

[000148] Uma diminuição estatisticamente significativa em fator de ceratinócito de BALF (KC), citocina induzível por interferon gama (IP-10), interleucina 1 α (IL-1 α) e fator-1 quimiotático de monócito de homogenato de pulmão (MCP-1) foi observada em animais tratados com hUTC e exposta a 90% de O₂ comparado a animais tratados com veículo de PBS e exposto a 90% de O₂ ($p < 0,02$). (figuras 2a e 2b, figuras 3 e 4).

Enxerto de Célula Humana

[000149] No dia quatro, pós-tratamento, os animais foram sacrificados, os pulmões foram colhidos e o RNA total foi isolado para detecção de célula humana. Os resultados mostraram a presença de hUTC nos pulmões de animais tratados com hUTC, porém ausente dos pulmões de animais tratados com PBS (Tabela 1-3).

[000150] Tabela 1-3. Detecção de Célula Humana. A presença de hUTC em pulmões de camundongo no dia quatro pós-tratamento foi determinada medindo-se as transcrições de mRNA de GAPDH específico humano utilizando PCR em tempo real. Os valores de limiar de ciclo (CT) menores do que 34 indicam que hUTC estão presentes no tecido pulmonar de camundongo. Nenhuma transcrição de mRNA de

hUTC detectada no tecido pulmonar de camundongo (Ausente).
Transcrições de mRNA de hUTC detectadas no tecido pulmonar de camundongo (Presente).

Grupo de Tratamento	Valor de CT Médio	HUTC em Pulmão de Camundongo
1	36,1	Ausente
1	36,5	Ausente
2	34,9	Ausente
2	34,4	Ausente
3	26,2	Presente
3	29,6	Presente
3	26,6	Presente
3	26,9	Presente
3	26,1	Presente
3	26,5	Presente

[000151] O efeito de administração intravenosa profilática de hUTC no desenvolvimento de lesão pulmonar aguda induzida por hiperoxia em camundongos foi avaliado. O nível reduzido de proteína total no BALF, em seguida a administração de hUTC em camundongos expostos a 90% de O₂, sugere que hUTC foram capazes de reduzir vazamento/edema vascular induzido por hiperoxia no pulmão. Além disso, os dados mostraram que hUTC causou uma redução nos níveis de três quimiocinas importantes sugerindo inflamação reduzida no pulmão. Estes dados fornecem evidência que hUTC podem ser um importante agente terapêutico para o tratamento de doença pulmonar.

EXEMPLO 2

Eficácia Terapêutica em um Modelo de Roedor de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

[000152] Este exemplo ilustra a eficácia de hUTC para realçar reparo e regeneração de pulmão em um modelo de roedor de lesão pulmonar induzida por fumo de cigarro. Os dados demonstram o valor terapêutico de hUTC para o tratamento de COPD preventivo.

Isolamento e Cultura de Célula do Umbigo

[000153] As células derivadas do umbigo (UDCs, hUTCs) foram preparadas como descrito nas Publicações de Patente dos Estados Unidos N^{os}. 2005/0032209, 2005/0058631 e 2005/0054098. As células foram cultivadas para a passagem desejada e em seguida criogenicamente conservadas.

Modelo Animal

[000154] Ratos SH saudáveis, machos, de 12 a 15 semanas de idade serão adquiridos de Charles River Laboratories, Raleigh, NC. Cada cepa de rato será randomizada por peso corporal em três grupos (Tabela 2-1). Os ratos SD em seguida serão expostos todo o corpo a fumaça de Tabaco (concentração de particulado total 75-85 mg/m(3)) ou ar ambiente filtrado durante 6 h/dia durante 15 dias (3 dias/semana).

Preparação de Dose

[000155] No dia 15, o tratamento do hábito de fumar será terminado e o veículo de hUTC ou PBS será administrado. Imediatamente antes da injeção, hUTC será descongelado a 37°C (banho com água), lavado duas vezes em salina tamponada de fosfato (PBS) e ressuspensas em 1 mL de PBS. As células serão contatadas utilizando um hemocítômetro. A viabilidade de célula será determinada por exclusão de azul triptano. As células serão reconstituídas nas concentrações apropriadas de 1e⁶ células e 3e⁶ células em 2 mL de PBS. As células serão lentamente administradas através de injeção na veia da cauda durante um intervalo de dois minutos.

[000156] Duas semanas após as injeções de veículo ou hUTC, os animais serão sacrificados para colher o fluido de lavagem broncoalveolar (BALF) (8 animais/grupo de tratamento) e tecido pulmonar (8 animais/grupo de tratamento).

Tabela 2-1. Desígnio Experimental.

Grupo de Tratamento	Atmosfera	Tempo de Administração	Tratamento
1	Ar Ambiente	0	PBS
2	Fumaça	0	PBS
3	Fumaça	0	1e ⁶ hUTC
4	Fumaça	0	3e ⁶ hUTC

Preparação de BALF

[000157] Para preparar BALF, oito animais por grupo de tratamento serão eutanizados e os pulmões serão lavados uma vez com 1,0mL de PBS estéril (Invitrogen) e os tubos contendo BALF fresco serão colocados em gelo úmido. O BALF será centrifugado em 1000 rpm durante 5 min e o fluido sobrenadante será removido e utilizado para outra análise.

Análise de Citocina de BALF

[000158] Os níveis de citocina/quimiocina de BALF serão determinados utilizando um kit de 22 contas múltiplas de camundongo (Millipore) seguindo o protocolo do fabricante e analisados utilizando uma máquina BioRad Bioplex. Os resultados serão representados graficamente e analisados utilizando Software GraphPad Prism.

Análise de Proteína Total de BALF

[000159] Para determinar a proteína total em cada amostra, BALF livre de célula será analisado utilizando um Ensaio de Proteína BCA (Pierce). A análise será completada utilizando o programa Softmax 4.0 e os dados serão representados graficamente utilizando Software Software Graph Pad Prism.

Histologia

[000160] Os pulmões serão colhidos de oito animais por grupo de tratamento. A metade de cada pulmão será fixado com 10% de solução

de tampão neutro de formaldeído durante 24 horas, desidratada em uma série de etanol graduado, embebida em parafina, e cortada em fatias de 5 µm. As seções de parafina serão manchadas com hematoxilina-eosina (HE) e Masson para análise histopatológica. A metade de pulmão restante será congelada instantaneamente e processada para MPO e detecção de célula humana (vide, abaixo).

Atividade de Mieloperoxidase (MPO)

[000161] Cerca de 200 mg de tecido pulmonar do lóbulo superior direito será homogenizado em 20 mmol/L de tampão de fosfato de potássio (pH7,4) e ultracentrifugado. A precipitação será conservada a -70°C com HTAB para medição de MPO. A atividade de MPO em seguida será determinada.

Isolamento de RNA

[000162] O RNA total será isolado de todo o tecido pulmonar congelado instantaneamente por Asuragen, Inc., de acordo com os procedimentos operacionais padrões da companhia. A pureza e quantidade de amostras de RNA total será determinada por leituras de absorbância em 260 e 280 nm utilizando um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 UV. A integridade de RNA será avaliada utilizando um Bioanalisador Agilent.

Detecção de Célula Humana

[000163] Os ensaios específicos de humano para mRNA de GAPDH (Hs99999905_m1_GAPDH) serão utilizados para estimar o número de hUTC no tecido pulmonar de camundongo. As amostras de análise RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) utilizando Ensaios de TaqMan® de tubo único (Applied Biosystems) serão processadas por Asuragen, Inc., de acordo com os procedimentos operacionais padrões da companhia. As diluições de RNA total serão transcritas reversas utilizando o Kit de Síntese de cDNA de Alta Capacidade TaqMan® (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante e em um volume de reação

total de 20 microlitros por diluição. 50 ng de cDNA de influxo em seguida serão analisados por PCR. Todas as amplificações serão realizadas em triplicata em um termociclizador de tempo real ABI 7500 validado. Em seguida a incubação a 95°C durante 10 minutos, as amostras foram amplificadas em 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, em seguida 60°C durante 1 minuto.

EXEMPLO 3

Efeitos Antifibróticos e Protetores Pulmonares em um Modelo de Roedor de Fibrose Pulmonar

[000164] Este exemplo ilustra a eficácia de hUTC para prevenir fibrose e realçar o reparo e regeneração do pulmão em um modelo de roedor de fibrose pulmonar induzida por bleomicina (BLM).

[000165] Isolamento de Cultura de Célula Umbilical. Células derivadas do umbigo (UDC, hUTC) foram preparadas como descrito nas Publicações de Patente dos Estados Unidos N^{os} 2005/0032209, 2005/0058631 e 2005/0054098. As células foram cultivadas para a passagem desejada e em seguida criogenicamente conservadas.

Modelo Animal

[000166] Sessenta e quatro ratos Sprague-Dawley adultos (200-250 g de peso corporal) serão obtidos e randomicamente divididos em quatro grupos com dezesseis ratos em cada grupo. Os animais serão perfundidos intratecalmente com 5 mg/kg de BLM. Imediatamente antes da injeção, hUTC será descongelado a 37°C (banho com água), lavado duas vezes em salina tamponada de fosfato (PBS) e ressuspensos em 1 mL de PBS. As células serão contatadas utilizando hemocítômetro. A viabilidade de célula será determinada por exclusão de azul tripano. As células serão reconstituídas na concentração apropriada em 2 mL de PBS. As células serão lentamente administradas através de injeção na veia da cauda durante um intervalo de dois minutos. O desígnio do estudo é resumido na Tabela 3-1 abaixo.

[000167] Nos grupos de tratamento de hUTC, $0,1 \times 10^6$, 1×10^6 ou 3×10^6 hUTC serão injetados na veia da cauda doze horas após a perfusão de BLM. O veículo de PBS sozinho será administrado de um modo similar como nos grupos de tratamento de hUTC. Duas semanas após as injeções de veículo ou hUTC, os animais serão sacrificados para colher o fluido de lavagem broncoalveolar (BALF) (8 animais/grupo de tratamento) e tecido pulmonar (8 animais/grupo de tratamento).

Tabela 3-1. Desígnio Experimental.

Grupo de Tratamento	BLM (mg/kg)	Tratamento
1	5	PBS
2	5	$0,1 \times 10^6$ hUTC
3	5	1×10^6 hUTC
4	5	3×10^6 hUTC

Preparação de BALF

[000168] Para preparar BALF, oito animais por grupo de tratamento serão eutanizados e os pulmões serão lavados uma vez com 1,0 mL de PBS estéril (Invitrogen) e os tubos contendo BALF fresco serão colocados no gelo úmido. O BALF será centrifugado em 1000 rpm durante 5 min e o fluido sobrenadante será removido e utilizado para outra análise.

Análise de Citocina de BALF

[000169] Os níveis de citocina/quimiocina de BALF serão determinados utilizando um kit de 22 contas múltiplas de camundongo (Millipore) seguindo o protocolo do fabricante e analisados utilizando uma máquina BioRad Bioplex. Os resultados serão representados graficamente e analisados utilizando Software GraphPad Prism.

Análise de Proteína Total de BALF

[000170] Para determinar a proteína total em cada amostra, BALF livre de célula será analisado utilizando um Ensaio de Proteína BCA (Pierce). A análise será completada utilizando o programa Softmax 4.0 e os dados serão representados graficamente utilizando o Software Graph Pad Prism.

Histologia

[000171] Os pulmões serão colhidos de oito animais por grupo de tratamento. A metade de cada pulmão será fixada com 10% de solução de tampão neutra de formaldeído durante 24 horas, desidratada em uma série de etanol graduado, embebida em parafina, e cortada em fatias de 5 µm. As seções de parafina serão manchadas com hematoxilina-eosina (HE) e Masson para análise histopatológica. A metade do pulmão restante será congelada instantaneamente e processada para detecção de célula humana (vide, abaixo).

Detecção de célula humana

[000172] RNA total será isolado de todo o tecido pulmonar congelado instantaneamente por Asuragen, Inc., de acordo com os procedimentos operacionais padrões da companhia. A pureza e quantidade de amostras de RNA total serão determinadas por leituras de absorbância em 260 e 280 nm utilizando um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 UV. A integridade de RNA será avaliada utilizando um Bioanalisador Agilent.

[000173] Os ensaios específicos de humano para mRNA de GAPDH (Hs99999905_m1_GAPDH) serão utilizados para estimar o número de hUTC no tecido pulmonar de camundongo. As amostras para análise de RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) utilizando Ensaios TaqMan® de tubo único (Applied Biosystems) serão processadas por Asuragen, Inc., de acordo com os procedimentos operacionais padrões da companhia. As diluições de RNA total serão transcritas reversas utilizando o Kit de Síntese de cDNA de Alta Capacidade TaqMan® (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante e em um volume de reação total de 20 microlitros por diluição. 50 ng de cDNA de influxo em seguida serão analisados por PCR. Todas as amplificações serão realizadas em triplicata em um termociclizador em tempo real ABI 7500 validado. Em seguida a incubação a 95°C durante 10 minutos, as amostras serão amplificadas em 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, em seguida

60°C durante 1 minuto.

EXEMPLO 4

Eficácia Protetora Pulmonar em um Modelo de Roedor de Enfisema Induzida por Elastase

[000174] Este estudo demonstrará a eficácia de hUTC intravenosamente administrado no tratamento, melhora e/ou prevenção de enfisema induzida por elastase em um modelo de roedor.

[000175] Os camundongos ou ratos C57BL/6N serão anestesiados com éter ou injeção intraperitoneal de cetamina (90 mg/kg) e xilazina (1 mg/kg) e dada administração intranasal de 0,3 ou 1,2 unidade de elastase pancreática porcina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A). Os camundongos de controle receberão administração intranasal de salina sozinha.

[000176] Duas a vinte e quatro horas após tratamento com elastase, concentrações crescentes de células derivadas de tecido umbilical humano (hUTC) serão administradas através de injeção na veia da cauda. Como descrito na Tabela 4.1, $0,1 \times 10^6$, 1×10^6 ou 3×10^6 hUTC, reconstituídos em veículo PBS, serão administrados em um volume total de 200ul. O veículo de PBS, sem hUTC será administrado de um modo similar como nos grupos de tratamento de hUTC. Duas semanas após as injeções de veículo ou hUTC, os animais serão sacrificados para colher as amostras de tecido pulmonar e fluido de lavagem broncoalveolar (BALF), que será armazenado a -70°C antes das análises.

Tabela 4.1. Desígnio Experimental.

Grupo de Tratamento	Tratamento
1	PBS
2	$0,1 \times 10^6$ de hUTC
3	1×10^6 de hUTC
4	3×10^6 de hUTC

Análise de BALF

[000177] Para preparar BALF, todos os animais serão eutanizados e os pulmões serão lavados uma vez com 1,0 mL de PBS estéril (Invitrogen) e os tubos serão colocados em gelo úmido. O BALF será centrifugado em 1000 rpm durante 5 min e o fluido sobrenadante será removido e utilizado para análise adicional.

[000178] Os níveis de citocina/quimiocina em ambos sobrenadantes de homogenato de BALF e pulmão serão determinados utilizando um kit de 22 contas múltiplas de camundongo (Millipore) seguindo o protocolo do fabricante e analisados utilizando uma máquina BioRad Bioplex. Os resultados serão representados graficamente e analisados utilizando Software GraphPad Prism.

Análise de Proteína Total de BALF

[000179] Para determinar a proteína total em cada amostra, BALF livre de célula será analisado utilizando um Ensaio de Proteína BCA (Pierce). A análise será completada utilizando o programa Softmax 4.0 e os dados serão representados graficamente utilizando Software Graph Pad Prism.

Histologia

[000180] As amostras de tecido pulmonar serão fixadas com 10% de solução de tampão neutra de formaldeído durante 24 horas, desidratadas em uma série de etanol graduado, embebidas e parafina, e cortada em fatias de 5 µm. As seções de parafina serão manchadas com hematoxolína-eosina (H&E) e Masson para análise de histopatologia.

Detecção de Célula Humana

[000181] RNA total será isolado de tecidos de camundongo por Asuragen, Inc., de acordo com os procedimentos operacionais padrões da companhia. A pureza e quantidade de amostras de RNA total serão determinadas por leituras de absorbância em 260 e 280 nm utilizando um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 UV. A integridade de RNA

será avaliada utilizando um Bioanalisador Agilent.

[000182] Os ensaios específicos de humano para mRNA de GAPDH (Hs99999905_m1_GAPDH) serão utilizados para estimar o número de hUTC no tecido pulmonar de camundongo. As amostras para análise de RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) utilizando Ensaios TaqMan® de tubo único (Applied Biosystems) serão processadas por Asuragen, Inc., de acordo com os procedimentos operacionais padrões da companhia. As diluições de RNA total serão transcritas reversa utilizando o Kit de Síntese de cDNA de Alta Capacidade TaqMan® (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante e em um volume de reação total de 20 microlitros por diluição. 50 ng de cDNA de influxo em seguida serão analisados por PCR. Todas as amplificações serão realizadas em triplicata em um termociclizador em tempo real ABI 7500 validado. Em seguida a incubação em 95°C durante 10 minutos, as amostras serão amplificadas em 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, em seguida 60°C durante 1 minuto. O número total de hUTC nos pulmões de camundongo será estimado com base em uma curva padrão gerada por análise das quantidades conhecidas de RNA total de hUTC purificado.

Proteína Total de BALF

[000183] Uma diminuição estatisticamente significativa em concentração de proteína total BALF será observada em animais tratados com hUTC comparado com animais tratados com controle de veículo. Além disso, é possível que o acúmulo de neutrófilos significativo seja observado em animais de controle de PBS, porém pode ser reduzido nos grupos de tratamento de hUTC.

Análise de Citocina de BALF/Proteína de Matriz Extracelular

[000184] Uma diminuição estatisticamente significativa em citocinas profibróticas e/ou pró-inflamatórias será observada em animais tratados com hUTC comparados com animais tratados com controle de veículo. Além disso, elastase aumentará o teor de ECM em fluido de lavagem

broncoalveolar, um marcador para lesão pulmonar. Estes efeitos serão atenuados por tratamento com hUTC.

Análise Histológica

[000185] Tratamento de elastase resultará no desenvolvimento de áreas subpleurais de inflamação que abrangem uma porção significativa do parênquima pulmonar. Além disso, a perda de arquitetura dos brônquios e alveolar normal bem como vasculatura será observada. A administração de hUTC logo após o desafio com elastase reduzirá a extensão da inflamação e dano no pulmão como evidenciado por grandes áreas de tecido não danificado com arquitetura alveolar normal.

Enxerto de Célula Humana

[000186] As células humanas serão detectadas nos pulmões de roedores tratados com hUTC porém ausente de animais tratados com veículo de PBS.

EXEMPLO 5

Isolamento de Células

[000187] Isolamento de célula umbilical. Os cordões umbilicais foram obtidos de National Disease Research Interchange (NDRI, Filadélfia, PA). Os tecidos foram obtidos seguindo liberações normais. Os protocolos de isolamento de célula foram realizados assepticamente em um cabo de fluxo laminar. Para remover o sangue e os resíduos, o cordão foi lavado em salina tamponada de fosfato (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) na presença de penicilina em 100 Unidades/mililitro, estreptomicina em 100 miligramas/mililitro e anfotericina B em 0,25 micrograma/mililitro (Invitrogen Carlsbad, CA). Os tecidos foram em seguida mecanicamente dissociados em 150 cm² de placas de cultura de tecido na presença de 50 mililitros de meio (DMEM de baixo teor de glicose ou DMEM de elevado teor de glicose; Invitrogen) até que o tecido tenha sido picado em uma polpa fina. Os tecidos picados foram transferidos para tubos cônicos de 50 mililitros (aproximadamente 5

gramas de tecido por tubo).

[000188] O tecido foi em seguida digerido em meio de DMEM com baixo teor de glicose ou meio de DMEM com alto teor de glicose, cada contendo penicilina em 100 Unidades/mililitro, estreptomicina em 100 miligramas/mililitro, anfotericina B em 0,25 micrograma/mililitro e as enzimas de digestão. Em alguns experimentos uma mistura de enzima de collagenase e dispase foi utilizada ("C:D") (collagenase (Sigma, St Louis, MO), 500 Unidades/mililitro; e dispase (Invitrogen), 50 Unidades/mililitro, em meio com baixo teor de glicose de DMEM). Em outros experimentos uma mistura de collagenase, dispase e hialuronidase ("C:D:H") foi utilizada (C:D:H = collagenase, 500 Unidades/mililitro; dispase, 50 Unidades/mililitro; e hialuronidase (Sigma), 5 Unidades/mililitro, em baixo teor de glicose de DMEM). Os tubos cônicos contendo o tecido, veículo e enzimas de digestão foram incubados a 37°C em um agitador orbital (Environ, Brooklyn, NY) em 225 rpm durante duas horas.

[000189] Após a digestão, os tecidos foram centrifugados em 150 x g durante 5 minutos, o sobrenadante foi aspirado. O pélete foi ressuspenso em 20 mililitros de meio de crescimento (DMEM:baixo teor de glicose e (Invitrogen), 15 por cento (v/v) de soro bovino fetal (FBS; soro bovino fetal definido; Lote N°. AND18475; Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma), penicilina em 100 Unidades por mililitro, estreptomicina em 100 microgramas por mililitro, e anfotericina B em 0,25 micrograma por mililitro (cada de Invitrogen, Carlsbad, CA)). A suspensão de célula foi filtrada através de um Coador de Célula BD FALCON de náilon de 70-mícrons (BD Biosciences, San Jose, CA). Um adicional de 5 mililitros de enxágue compreendendo meio de crescimento foi passado através do coador. A suspensão de célula foi em seguida passada através de um coador de célula de náilon de 40-micrômetros (BD Biosciences, San Jose, CA) e perseguida com um enxague de um adicional de 5 mililitros de meio de crescimento.

[000190] O filtrado foi ressuspenso em meio de crescimento (volume total de 50 mililitros) e centrifugado em 150 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e as células foram ressuspensas em 50 mililitros de meio de crescimento fresco. Este processo foi repetido mais duas vezes.

[000191] Após a centrifugação final, o sobrenadante foi aspirado e o pélete de célula foi ressuspenso em 5 mililitros de meio de crescimento fresco. O número de células viáveis foi determinado utilizando manchamento de azul tripiano. As células foram em seguida cultivadas sob condições padrões.

[000192] As células isoladas de tecido de cordão umbilical foram semeadas em 5.000 células/cm² em frascos T-75 revestidos com gelatina (Corning Inc., Corning, NY) em meio de crescimento. Após dois dias, o meio gasto e as células não aderidas foram aspirados dos frascos. As células aderentes foram lavadas com PBS três vezes para remover os resíduos e as células derivadas do sangue. As células foram em seguida reabastecidas com meio de crescimento e permitidas crescer para confluência (cerca de 10 dias de passagem 0 a passagem 1). Em passagens subsequentes (de passagem 1 a 2 etc), células alcançaram subconfluência (75-85 por cento de confluência) em 4-5 dias. Para estas passagens subsequentes, as células foram semeadas em 5.000 células/cm². As células foram crescidas em uma incubadora umidificada com 5 por cento de dióxido de carbono a 37°C.

[000193] Em algumas experiências, as células foram isoladas de tecidos de pós-parto em meio com baixo teor de glicose de DMEM após digestão com LIBERASE (2,5 miligramas por mililitro, Blendzima 3; Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN) e hialuronidase (5 Unidades/mililitro, Sigma). A digestão do tecido e isolamento das células foi como descrito para outras digestões de protease acima, entretanto, a mistura de LIBERASE/hialuronidase foi utilizada ao invés da mistura

de C:D ou C:D:H. A digestão de tecido foi LIBERASE resultado no isolamento de populações de célula de tecido de pós-parto que expandiram facilmente.

[000194] Os procedimentos foram comparados para isolar células do cordão umbilical utilizando combinações diferentes de enzima. As enzimas comparadas para digestão incluíram: i) collagenase; ii) dispase; iii) hialuronidase; iv) mistura de collagenase:dispase (C:D); v) mistura de collagenase:hialuronidase (C:H); vi) mistura de dispase:hialuronidase (D:H); e vii) mistura de collagenase:dispase:hialuronidase (C:D:H). As diferenças no isolamento de célula utilizando estas condições de digestão de enzima diferentes foram observadas (Tabela 5-1).

[000195] Outras tentativas foram feitas para isolar conjuntos de células de cordão umbilical por abordagens diferentes. Em um caso, o cordão umbilical foi fatiado e lavado com meio de crescimento para desalojar os coágulos de sangue e material gelatinoso. A mistura de sangue, material gelatinoso e meio de crescimento foi coletada e centrifugada em 150 x g. O pélete foi ressuspenso e semeado em frascos revestidos com gelatina em meio de crescimento. A partir destes experimentos uma população de célula foi isolada a qual foi facilmente expandida.

[000196] As células também foram isoladas de amostras de sangue do cordão obtidas de NDRI. O protocolo de isolamento utilizado foi aquele do Pedido de Patente Internacional PCT/US2002/029971 por Ho e outros. As amostras (50 mililitros e 10,5 mililitros, respectivamente) de sangue de cordão umbilical (NDRI, Filadélfia PA) foram misturadas com tampão de lise (cloreto de amônio de 155 milimolares esterilizado por filtro, 10 milimolares de bicarbonato de potássio, 0,1 milimolar de EDTA tamponado para pH 7,2 (todos os componentes de Sigma, St. Louis, MO)). As células foram lisadas em uma relação de 1:20 de sangue do cordão para tampão de lise. A suspensão de célula resultante foi vortexada durante 5 segundos, e incubada durante 2 minutos em

temperatura ambiente. O lisado foi centrifugado (10 minutos a 200 x g). O pélete de célula foi ressuspense em Meio Essencial Mínimo Completo (Gibco, Carlsbad CA) contendo 10 por cento de soro bovino fetal (Hyclone, Logan UT), 4 milimolares de glutamina (Mediatech Herndon, VA), penicilina em 100 Unidades por mililitro e estreptomicina em 100 microgramas por mililitro (Gibco, Carlsbad, CA). As células ressuspensas foram centrifugadas (10 minutos em 200 x g), o sobrenadante foi aspirado, e o pélete de célula foi lavado em meio completo. As células foram semeadas diretamente em frascos T75 (Corning, NY), frascos revestidos de laminina T75, ou frascos revestidos de fibronectina T175 (ambos de Becton Dickinson, Bedford, MA).

[000197] Para determinar se as populações de célula podem ser isoladas sob condições diferentes e expandidas sob uma variedade de condições imediatamente após o isolamento, as células foram digeridas em meio de crescimento com ou sem 0,001 por cento (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), utilizando a combinação de enzima de C:D:H, de acordo com os procedimentos fornecidos acima. Todas as células foram crescidas na presença de penicilina em 100 Unidades por mililitro e estreptomicina em 100 microgramas por mililitro. Sob todas as condições testadas as células se prenderam e expandiram bem entre as passagens 0 e 1 (Tabela 5-2). As células em condições 5-8 e 13-16 foram demonstradas proliferar bem até 4 passagens após a semeadura, ponto no qual elas foram crioconservadas.

[000198] A combinação de C:D:H, forneceu a melhor produção de célula em seguida ao isolamento, e gerou células que expandiram para muito mais gerações em cultura do que as outras condições (Tabela 5-1). Uma população de célula expandível não foi obtida utilizando colagenase ou hialuronidase sozinho. Nenhuma tentativa foi feita para determinar se este resultado é específico para a colagenase que foi testada.

Tabela 5-1: Isolamento de células de tecido de cordão umbilical

utilizando combinações de enzima variantes

Digestão de Enzima	Células Isoladas	Expansão de Célula
Colagenase	X	X
Dispase	+(>10 h)	+
Hialuronidase	X	X
Colagenase:Dispase	++(<3h)	++
Colagenase:Hialuronidase	++ (<3h)	+
Dispase:Hialuronidase	+(>10 h)	+
Colagenase:Dispase: Hialuronidase	+++(<3h)	+++

Principal: + = Bom, ++ = muito bom, +++ = excelente, X = nenhum sucesso

[000199] As células se prenderam e expandiram bem entre as passagens 0 e 1 sob todas as condições testadas para crescimento e digestão de enzima (Tabela 5-2). Células em condições experimentais 5-8 e 13-16 proliferaram bem até 4 passagens após a semeadura, ponto no qual elas foram criopreservadas. Todas as células foram criopreservadas para outra análise.

Tabela 5-2: Isolamento e Expansão de Cultura de Células Pós-Parto sob Condições Variantes:

Condição	Meio	15% de FBS	BME	Gelatina	20% de O ₂	Fatores de Crescimento
1	DMEM-Lg	Y	Y	Y	Y	N
2	DMEM-Lg	Y	Y	Y	N(5%)	N
3	DMEM-Lg	Y	Y	N	Y	N
4	DMEM-Lg	Y	Y	N	N(5%)	N
5	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N (Laminina)	Y	EGF/FGF (20 ng/ml)

6	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N (Laminina)	N(5%)	EGF/FGF (20 ng/ml)
7	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N (Fibronectina)	Y	PDGF/VEGF
8	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N (Fibronectina)	N(5%)	PDGF/VEGF
9	DMEM-Lg	Y	N	Y	Y	N
10	DMEM-Lg	Y	N	Y	N(5%)	N
11	DMEM-Lg	Y	N	N	Y	N
12	DMEM-Lg	Y	N	N	N(5%)	N
13	DMEM-Lg	N (2%)	N	N (Laminina)	Y	EGF/FGF (20 ng/ml)
14	DMEM-Lg	N (2%)	N	N (Laminina)	N(5%)	EGF/FGF (20 ng/ml)
15	DMEM-Lg	N (2%)	N	N (Fibronectina)	Y	PDGF/VEGF
16	DMEM-Lg	N (2%)	N	N (Fibronectina)	N(5%)	PDGF/VEGF

[000200] As células nucleadas se prenderam e cresceram rapidamente. Estas células foram analisadas por citometria de fluxo e foram similares às células obtidas por digestão de enzima.

[000201] As preparações contiveram plaquetas e células de sangue vermelhas. Nenhuma célula nucleada se prendeu e dividiu durante as 3 primeiras semanas. O meio foi mudado 3 semanas após a sementeação e nenhuma célula foi observada se prender e crescer.

[000202] As populações de células podem ser isoladas do tecido umbilical eficientemente utilizando a combinação de enzima collagenase (uma metaloprotease), dispase (protease neutral) e hialuronidase (enzima mucolítica que quebra o ácido hialurônico). LIBERASE, que é uma mistura de collagenase e uma protease neutra, também pode ser utilizada. Blendzima 3, que é collagenase (4 Unidades/grama de Wunsch) e termolisina (1714 Unidades/grama de caseína), foi também utilizado junto com hialuronidase para isolar as células. Estas células se expandiram facilmente sobre muitas passagens quando cultivadas em meio de expansão de crescimento em plástico revestido de gelatina.

[000203] As células foram também isoladas de sangue residual nos cordões, porém não o sangue do cordão. A presença de células em coágulos de sangue lavados do tecido, que aderem e crescem sob as condições utilizadas, pode ser devido às células sendo liberadas durante o processo de dissecação.

EXEMPLO 6

Características de Crescimento de Células

[000204] O potencial de expansão de célula de células derivadas do umbigo foi comparado com outras populações de células-tronco isoladas. O processo de expansão de célula para senescência é referido como limite de Hayflick. (Hayflick, L, J. Am. Geriatr. Soc, Wi '4; 22(1): 1-12; Hayflick, L, Gerontologist, 1974; 14(I):37-45).

[000205] Os frascos plásticos de cultura de tecido foram revestidos adicionando-se 20 mililitros 2% (p/v) de gelatina (Tipo B: 225 Bloom; Sigma, St Louis, MO) a um frasco T75 (Corning Inc., Corning, NY) durante 20 minutos em temperatura ambiente. Após remover a solução de gelatina, 10 mililitros de salina tamponada de fosfato (PBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) foram adicionados e em seguida aspirados.

[000206] Para comparação de potencial de expansão de crescimento as seguintes populações de célula foram utilizadas; i) células-tronco mesenquimais (MSC; Cambrex, Walkersville, MD); ii) células derivadas de adipose (Patente dos Estados Unidos Nº 6.555.374 B1; Pedido de Patente dos Estados Unidos US20040058412); iii) fibroblastos de pele dérmica normais (cc-2509 lote Nº 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD); e iv) células derivadas do umbigo. As células foram inicialmente semeadas em 5.000 células/cm² em frascos T75 revestidos de gelatina em meio de crescimento. Para passagens subsequentes, as culturas de célula foram tratadas como segue. Após tripsinização, células viáveis foram contadas após manchamento de azul tripano. A suspensão de célula (50 microlitros) foi combinada com azul tripano (50 microlitros, Sigma, St. Louis MO). Os números de célula viáveis foram estimados utilizando um hemocitômetro.

[000207] Em seguida a contagem, as células foram semeadas em 5.000 células/cm² sobre frascos T75 revestido de gelatina em 25 mililitros de meio de crescimento fresco. As células foram crescidas em uma atmosfera padrão (5 por cento de dióxido de carbono (v/v)) a 37°C.

O meio de crescimento foi mudado duas vezes por semana. Quando as células alcançaram cerca de 85 por cento de confluência elas foram passadas; este processo foi repetido até que as células alcançassem senescência.

[000208] Em cada passagem, as células foram tripsinizadas e contadas. A produção de célula viável, duplicações de população [\ln (células finais/células iniciais)/ $\ln 2$], e tempo de duplicação (tempo em cultura/duplicação de população) foram calculados. Para o propósito de determinar a expansão de célula ideal, o produto de célula total por passagem foi determinado multiplicando-se o produto total pela passagem prévia pelo fator de expansão para cada passagem (isto é, fator de expansão = células finais/células iniciais).

[000209] O potencial de expansão de células bancadas na passagem 10 foi também testado. Um conjunto diferente de condições foi utilizado. Os fibroblastos de pele dérmica normal (cc-2509 lote N° 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD) e células derivadas do umbigo foram testados. Estas populações de células foram bancadas na passagem 10 previamente, tendo sido cultivadas em 5.000 células/cm² em cada passagem para aquele ponto. O efeito de densidade de célula nas populações de célula em seguida ao descongelamento na passagem 10 foi determinado. As células foram descongeladas sob condições padrões e contadas utilizado manchamento de azul tripano. As células descongeladas foram em seguida semeadas em 1.000 células/cm² em meio de crescimento. As células foram crescidas sob condições atmosféricas padrões a 37°C. O meio de crescimento foi mudado duas vezes por semana. As células foram passadas uma vez que elas alcançaram cerca de 85% de confluência. As células foram subsequentemente passadas até a senescência, isto é, até que elas não pudessem ser ainda mais expandidas. As células foram tripsinizadas e contadas em cada passagem. O produto de célula, duplicação de

população ($\ln(\text{células finais}/\text{células iniciais})/\ln 2$) e tempo de duplicação (tempo em cultura)/duplicação de população) foram calculados. O produto de célula total por passagem foi determinado multiplicando-se o produto total pelas passagens prévias pelo fator de expansão para cada passagem (isto é, fator de expansão = células finais/células iniciais).

[000210] O potencial de expansão de culturas de célula derivada de umbigo recentemente isoladas sob baixas condições de semeadura de célula foi testado em outro experimento. As células derivadas do umbigo foram isoladas como descrito em um exemplo prévio. As células foram semeadas em 1.000 células/cm² e passadas como descrito acima até a senescência. As células foram crescidas sob condições atmosféricas padrões a 37°C. O meio de crescimento foi mudado duas vezes por semana. As células foram passadas uma vez que elas alcançaram cerca de 85% de confluência. Em cada passagem, as células foram tripsinizadas e contadas por manchamento de azul tripiano. O produto de célula, duplicação de população ($\ln(\text{célula final}/\text{célula inicial})/\ln 2$) e tempo de duplicação (tempo em cultura/duplicação de população) foram calculados para cada passagem. O produto de célula total por passagem foi determinado multiplicando-se o produto total pelas passagens prévias pelo fator de expansão para cada passagem (isto é, fator de expansão = célula final/célula inicial). As células foram crescidas em gelatina e frascos revestidos de não gelatina.

[000211] Foi demonstrado que as condições de cultura de célula com baixo teor de O₂ podem melhorar a expansão de célula em certas circunstâncias. (Vide, por exemplo, US20040005704). Para determinar se a expansão de célula de células derivadas do umbigo pode ser melhorada alterando-se as condições de cultura de célula, as culturas de células derivadas do umbigo foram crescidas em condições de baixo teor de oxigênio. As células foram semeadas em 5.000 células/cm² em

meio de crescimento em frascos revestidos de gelatina. As células foram inicialmente cultivadas sob condições atmosféricas padrões através da passagem 5, na qual elas foram transferidas para condições de cultura com baixo teor de oxigênio (5% de O₂).

[000212] Em outros experimentos as células foram expandidas em placas não revestidas, revestidas com colágeno, revestidas com fibronectina, revestidas com laminina, e revestidas com matrigel. As culturas foram demonstradas expandir bem nestas matrizes diferentes.

[000213] As células derivadas do umbigo expandiram para mais do que 40 passagens gerando produtos de célula de > 1E17 células em 60 dias. Em contraste, MSCs e fibroblastos senesceram após < 25 dias e <60 dias, respectivamente. Embora ambas células derivadas de adiposa e omentais tenham expandido durante quase 60 dias, elas geraram produtos de célula totais de 4.5E12 e 4.24E13 respectivamente. Desse modo, quando semeadas em 5.000 células/cm² sob condições experimentais utilizadas, as células derivadas do umbigo expandiram muito melhor do que o outro tipo de células crescidas sob as mesmas condições (Tabela 6-1).

Tabela 6-1: Características de Crescimento para Diferentes Populações de Célula Crescida para Senescência

Tipo de Célula	Senescência	Duplicações de População Totais	Produto (Células Totais)
MSC	24 d	8	4,72 E7
Célula Derivada Adiposa	57 d	24	4,5 E12
Fibroblastos	53 d	26	2,82 E13
Umbilical	65 d	42	6,15 E17

[000214] As células de fibroblastos e derivadas de umbigo expandiram para mais do que 10 passagens gerando produtos de célula de > 1E11

células em 60 dias (Tabela 6-2). Sob estas condições tanto os fibroblastos quanto as populações de célula derivada do umbigo envelheceram após 80 dias, completando >50 e >40 duplicações de população respectivamente.

Tabela 6-2: Características de Crescimento para Diferentes Populações de Célula Utilizando Expansão de Crescimento de Baixa Densidade de Passagem 10 através da Senescência

Tipo de Célula (Nº. da Passagem)	Senescência	Duplicações de População Totais	Produto (Células Totais)
Fibroblastos (P10)	80 dias	43,68	2,59 E11
Umbilical (P10)	80 dias	53,6	1,25 E14

[000215] As células expandiram bem sob as condições de oxigênio reduzido, entretanto, a cultura sob condições de oxigênio baixo não parece ter um efeito significativo na expansão de célula para células derivadas de pós-parto. Estes resultados são preliminares no sentido que qualquer conclusão final a ser feita considerando o efeito de oxigênio reduzido seria mais bem extraída de experimentos em células em crescimento em baixo teor de oxigênio de isolamento inicial. As condições atmosféricas padrões já provaram ter sucesso para crescer números suficientes de células, e a cultura de baixo teor de oxigênio não é requerida para o crescimento de células derivadas de pós-parto.

[000216] As condições de expansão de célula correntes de crescimento de células derivadas do umbigo isoladas em densidades de cerca de 5.000 células/cm², em meio de crescimento em frascos não revestidos ou revestidos com gelatina, sob oxigênio atmosférico padrão, são suficientes para gerar grandes números de células na passagem 11. Além disso, os dados sugerem que as células podem ser facilmente expandidas utilizando condições de cultura de densidade mais baixa (por exemplo, 1.000 células/cm²). A expansão de célula derivada do

umbigo em condições de baixo teor de oxigênio também facilita a expansão de célula, embora nenhuma melhora incremental no potencial de expansão de célula já tenha sido observado quando utilizando estas condições para o crescimento. Atualmente, a cultura de células derivadas do umbigo sob condições atmosféricas padrão é preferida para gerar grandes grupos de células. Entretanto, quando as condições de cultura são alteradas a expansão de célula derivada do umbigo pode de outro modo ser alterada. Esta estratégia pode ser utilizada para realçar a capacidade proliferativa e diferenciativa destas populações de célula.

[000217] Sob as condições utilizadas, ao mesmo tempo em que o potencial de expansão de MSC e células derivadas adiposas é limitado, as células derivadas do umbigo expandem facilmente para números maiores

EXEMPLO 7

Crescimento de Células em Meio Contendo D-Valina

[000218] Foi reportado que o meio contendo D-valina ao invés da isoforma de L-valina normal pode ser utilizado para seletivamente inibir o crescimento de células em cultura semelhantes ao fibroblasto. (Hongpaisan, J, Cell Biol Int., 2000; 24:1-7; Sordillo, L M, e outros, Cell Biol Int Rep., 1988; 12:355-64). Os experimentos foram realizados para determinar se as células derivadas do umbigo puderam crescer em meio contendo D-valina.

[000219] As células derivadas do umbigo (P5) e fibroblastos (P9) foram semeadas em 5.000 células/cm² em frascos T75 revestidos de gelatina (Corning, Corning, NY). Após 24 horas o meio foi removido e as células foram lavadas com salina tamponada de fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, Ca.) para remover o meio residual. O meio foi substituído com um meio de crescimento modificado (DMEM com D-valina (ordem especial Gibco), 15% (v/v) de soro bovino fetal dializado

(Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) de betamercaptoetanol (Sigma), penicilina em 50 Unidades/mililitro e estreptomicina em 50 miligramas/mililitro (Gibco)).

[000220] As células derivadas do umbigo e células de fibroblasto semeadas no meio contendo D-valina não proliferaram, diferente das células semeadas em meio de crescimento contendo soro dializado. As células de fibroblastos mudaram morfológicamente, aumentando em tamanho e mudando a forma. Todas as células morreram e eventualmente se desprenderam da superfície do frasco após quatro semanas. Desse modo, pode ser concluído que as células derivadas de tecido de cordão umbilical requerem L-valina para o crescimento celular e para manter a viabilidade por longo prazo. L-valina é preferivelmente não removida do meio de crescimento para células derivadas de tecido de cordão umbilical.

EXEMPLO 8

Análise de Cariótipo das Células

[000221] As linhagens celulares utilizadas em terapia de célula são preferivelmente homogêneas e livres de qualquer tipo de célula contaminante. As células humanas utilizadas na terapia de célula devem ter um número normal (46) de cromossomos com estrutura normal. Para identificar as linhagens celulares derivadas de umbigo que são homogêneas e livres de células de origem de tecido não umbilical, os cariótipos de amostras de célula foram analisados.

[000222] UTC de tecido pós-parto de um recém-nascido de sexo masculino foram cultivados em meios de crescimento. O tecido pós-parto de um recém-nascido do sexo masculino (X, Y) foi selecionado para permitir distinção entre células derivadas de recém-nascidos e células de origem materna (X,X). As células foram semeadas em 5.000 células por centímetro quadrado em meio de crescimento em um frasco T25 (Corning, Corning, NY) e expandiram para 80% de confluência. Um

frasco T25 contendo células foi cheio até o gargalo com meio de crescimento. As amostras foram liberadas para um laboratório citogenético clínico por transportadora (o tempo de transporte estimado de laboratório para laboratório é uma hora). A análise do cromossoma foi realizada por Center for Human & Molecular Genetics na Escola de Medicina da Nova Jersey, Newark, NJ. As células foram analisadas durante metáfase quando os cromossomos são mais bem-visualizados. De vinte células em metáfase contada, cinco foram analisadas quanto ao número de cariótipo homogêneo normal (dois). Uma amostra de célula foi caracterizada como homogênea se dois cariótipos foram observados. Uma amostra de célula foi caracterizada como heterogênea se mais do que dois cariótipos forem observados. As células de metáfase adicionais foram contadas e analisadas quando um número de cariótipo heterogêneo (quatro) foi identificado.

[000223] Todas as amostras de célula enviadas para análise de cromossoma foram interpretadas pela equipe de laboratório de citogenética como exibindo uma aparência normal. Três das dezesseis linhagens celulares analisadas exibiram um fenótipo heterogêneo (XX e XY) indicando a presença de células derivadas tanto de origem neonatal quanto materna (Tabela 8-1). Cada das amostras de célula foi caracterizada como homogênea. (Tabela 8-1).

Tabela 8-1. Resultados de Cariótipos de UTC.

Tecido	Passagem	Células de Metáfase Contadas	Células de Metáfase Analisadas	Número de Cariótipos	Cariótipos de ISCN
Umbilical	23	20	5	2	46, XX
Umbilical	6	20	5	2	46, XY
Umbilical	3	20	5	2	46, XX

[000224] A análise do cromossoma identificou UTC derivada de umbigo cujos cariótipos parecem normais quando interpretados por um laboratório de citogenética clínico. A análise de cariótipo também

identificou linhagens celulares livres de células maternas, como determinado por cariótipo homogêneo.

EXEMPLO 9

Avaliação Citométrica de Fluxo de Marcadores de Superfície de Célula

[000225] A caracterização de proteínas de superfície de célula ou "marcadores" por citometria de fluxo pode ser utilizada para determinar uma identidade de linhagem celular. A consistência da expressão pode ser determinada de múltiplos doadores, e em células expostas para diferenciar as condições de processamento e cultura. As linhagens de célula pós-parto isoladas do umbigo foram caracterizadas por citometria de fluxo, fornecendo um perfil para a identificação destas linhagens celulares.

[000226] As células foram cultivadas em meio de crescimento, em frascos de cultura de tecido T75, T150, e T225 tratados com plasma (Corning, Corning, NY) até confluentes. As superfícies de crescimento dos frascos foram revestidas com gelatina incubando-se 2% (p/v) de gelatina (Sigma, St. Louis, MO) durante 20 minutos em temperatura ambiente.

[000227] As células aderentes em frascos foram lavadas em salina tamponada de fosfato (PBS); (Gibco, Carlsbad, MO) e desprendidas com tripsina/EDTA (Gibco). As células foram colhidas, centrifugadas e ressuspensas em 3% (v/v) de FBS em PBS em uma concentração de célula de 1×10^7 por mililitro. De acordo com as especificações do fabricante, o anticorpo para o marcador de superfície de célula de interesse (vide abaixo) foi adicionado a 100 microlitros de suspensão de célula e a mistura foi incubada no escuro durante 30 minutos a 4°C. Após incubação, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas para remover o anticorpo não ligado. As células foram ressuspensas em 500 microlitros de PBS e analisadas por citometria de fluxo. A análise de citometria de fluxo foi realizada com um instrumento de FACS calibur

(Becton Dickinson, San Jose, CA).

[000228] Os seguintes anticorpos para marcadores de superfície de célula foram utilizados.

Tabela 9-1: Anticorpos utilizados na caracterização de marcadores de superfície de célula de UDCs.

Anticorpo	Fabricante	Número do Catálogo
CD10	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555375
CD13	BD Pharmingen	555394
CD31	BD Pharmingen	555446
CD34	BD Pharmingen	555821
CD44	BD Pharmingen	555478
CD45RA	BD Pharmingen	555489
CD73	BD Pharmingen	550257
CD90	BD Pharmingen	555596
CD117	BD Pharmingen	340529
CD141	BD Pharmingen	559781
PDGFr-alfa	BD Pharmingen	556002
HLA-A, B, C	BD Pharmingen	555553
HLA-DR, DP, DQ	BD Pharmingen	555558
IgG-FITC	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
IgG- PE	Sigma	P-4685

[000229] As células derivadas do umbigo foram analisadas nas passagens 8, 15, e 20.

[000230] Para comparar diferenças entre os doadores, as células derivadas de tecido de cordão umbilical de diferentes doadores foram comparadas com cada outra.

[000231] As células derivadas do umbigo cultivadas em frascos revestidos de gelatina foram também comparadas com células derivadas do umbigo cultivadas em frascos não revestidos.

[000232] Quatro tratamentos utilizados para isolamento e preparação de células foram comparados. As células derivadas de tecido de pós-parto por tratamento com: 1) colagenase; 2) colagenase/dispase; 3) colagenase/hialuronidase; e 4) colagenase/hialuronidase/dispase foram comparadas.

[000233] As células derivadas do cordão umbilical nas passagens 8, 15, e 20 analisadas por citometria de fluxo todas expressaram CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa e HLA-A, B, C, indicados por fluorescência aumentada relativo ao controle de IgG. Estas células foram

negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, e HLA-DR, DP, DQ, indicado por valores de fluorescência de acordo com o controle de IgG.

[000234] As células derivadas de cordão umbilical isoladas de doadores separados analisadas por citometria de fluxo cada mostrou positivo para a produção de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa e HLA-A, B, C, refletido nos valores aumentados de fluorescência relativo ao controle de IgG. Estas células foram negativas para a produção de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, e HLA-DR, DP, DQ com valores de fluorescência de acordo com o controle de IgG.

[000235] As células derivadas de cordão umbilical expandiram em frascos não revestidos e revestidos de gelatina analisados por citometria de fluxo foram todas positivas para a produção de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa e HLA-A, B, C, com valores aumentados de fluorescência relativo ao controle de IgG. Estas células foram negativas para a produção de CD31, CD34, CD45, CD117, CD 141, e HLA-DR, DP, DQ, com valores de fluorescência de acordo com o controle de IgG.

[000236] A análise de células derivadas do cordão umbilical por citometria de fluxo estabeleceu uma identidade destas linhagens celulares. Estas células derivadas do cordão umbilical são positivas para CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, e HLA-A,B,C; e negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 e HLA-DR, DP, DQ. Esta identidade foi consistente entre as variações em variáveis incluindo o doador, passagem, revestimento de superfície do vaso de cultura, enzimas de digestão, e camada placentária. Alguma variação nas faixas e médias da curva de histograma de valor de fluorescência individual foram observadas, porém todas as curvas positivas sob todas as condições testadas foram normais e os valores de fluorescência expressos maiores do que o controle de IgG, desse modo confirmando que as células compreendem uma população homogênea que tem expressão positiva dos marcadores.

EXEMPLO 10

Análise de Células por Disposição de Oligonucleotídeo

[000237] As disposições de oligonucleotídeo foram utilizadas para comparar os perfis de expressão de gene de células derivadas de placenta e derivadas do umbigo com fibroblastos, células-tronco mesenquimais humanas, e outra linhagem celular derivada da medula óssea humana. Esta análise forneceu uma caracterização das células derivadas de pós-parto e identificou marcadores moleculares únicos para estas células.

[000238] *Células derivadas de tecido de pós-parto.* A placenta e o cordão umbilical humano foram obtidos de National Disease Research Interchange (NDRI, Filadélfia, PA) de liberações normais de termo completo com o consentimento do paciente. Os tecidos foram recebidos e as células foram isoladas como descrito no Exemplo 5 após a digestão com uma mistura de C:D:H. As células foram cultivadas em meio de crescimento em frascos de cultura de tecido plásticos revestidos com gelatina. As culturas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂.

[000239] *Fibroblastos.* Os fibroblastos dérmicos humanos foram adquiridos de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; Número do Lote 9F0844) e ATCC CRL- 1501 (CCD39SK). Ambas as linhagens foram cultivadas em meio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) com 10% (v/v) de soro bovino fetal (Hyclone) e penicilina/estreptomicina (Invitrogen)). As células foram crescidas em plástico tratado para tecido padrão.

[000240] *Células-tronco mesenquimais humanas (hMSC).* hMSCs foram adquiridas de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; Números do Lote 2F1655, 2F1656 e 2F1657) e cultivadas de acordo com as especificações do fabricante em Meio MSCGM (Cambrex). As células foram crescidas em plástico de cultura de tecido padrão em 37°C com 5% de CO₂.

[000241] *Células da medula óssea da crista ilíaca humana (ICBM).* A

medula óssea de crista ilíaca humana foi recebida de NDRI com o consentimento do paciente. A medula foi processada de acordo com o método descrito por Ho, e outros. (WO03/025149). A medula foi misturada com tampão de lise (NH_4Cl a 155 mM, KHCO_3 a 10 mM, e EDTA a 0,1 mM, pH 7,2) em uma relação de 1 parte de medula óssea para 20 partes de tampão de lise. A suspensão de célula foi vortexada, incubada durante 2 minutos em temperatura ambiente, e centrifugada durante 10 minutos em 500 x g. O sobrenadante foi descartado e o pélete de célula foi ressuspensão em Meio-alfa Essencial Mínimo (Invitrogen) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal e glutamina a 4 mM. As células foram centrifugadas novamente e o pélete de célula foi ressuspensão em meio fresco. As células mononucleares viáveis foram contadas utilizando exclusão de azul tripano (Sigma, St. Louis, MO). As células mononucleares foram semeadas em frascos de cultura de tecidos plásticos em 5×10^4 células/cm². As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO_2 em O_2 atmosférico padrão ou em 5% de O_2 . As células foram cultivadas durante 5 dias sem uma mudança de meio. O meio e células não aderentes foram removidos após 5 dias de cultivo. As células aderentes foram mantidas em cultura.

[000242] As culturas ativamente crescentes de células foram removidas dos frascos com um raspador de célula em salina tamponada de fosfato fria (PBS). As células foram centrifugadas durante 5 minutos em 300 x g. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em PBS fresco e centrifugado novamente. O sobrenadante foi removido e o pélete de célula foi imediatamente congelado e armazenado a -80°C. O mRNA celular foi extraído e transcrito em cDNA. O cDNA foi em seguida transcrito em cRNA e rotulado com biotina. O cRNA rotulado com biotina foi hibridizado com disposições de oligonucleotídeo Affymetrix GENECHIP HG-U133A (Affymetrix, Santa Clara, CA). As hibridizações e coleção de dados foram realizadas de acordo com as especificações do fabricante. A

análise de dados foi realizada utilizando software de computador "Análise de Significância de Microdisposições" (SAM) versão 1.21 (Tusher, V.G. e outros, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 5116-5121). As licenças para o software de análise estão disponíveis através do Documento de Licenciamento de Tecnologia, Stanford University, e mais informação está disponível na World Wide Web no site da internet Professor Tibshirani's no Dep't of Statistics, Stanford University (www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/).

[000243] Quatorze diferentes populações de células foram analisadas neste estudo. As células, junto com a informação de passagem, substrato de cultura, e meios de cultura são listadas na Tabela 10-1.

Tabela 10-1. Células analisadas pelo estudo de microdisposição. As linhagens de células são listadas por seu código de identificação junto com a passagem no tempo da análise, substrato de crescimento de célula, e meios de crescimento.

População de célula	Passagem	Substrato	Meio
Umbilical (022803)	2	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-BME
Umbilical (042103)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-BME
Umbilical (071003)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-BME
Placenta (042203)	12	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-BME
Placenta (042903)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-BME
Placenta (071003)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-BME
ICBM (070203) (5% O ₂)	3	Plástico	MEM 10% FBS
ICBM (062703) (std O ₂)	5	Plástico	MEM 10% FBS
ICBM (062703) (5% O ₂)	5	Plástico	MEM 10% FBS
hMSC (Lot 2F1655)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lot 2F1656)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lot 2F1657)	3	Plástico	MSCGM
hFibroblasto (9F0844)	9	Plástico	DMEM-F12, 10% FBS
hFibroblasto (CCD39SK)	4	Plástico	DMEM-F12, 10% FBS

[000244] Os dados foram avaliados por análise de componente principal com software SAM como descrito acima. A análise revelou 290 genes que foram expressos em diferentes quantidades relativas nas

células testadas. Esta análise forneceu comparações relativas entre as populações.

[000245] A Tabela 10-2 mostra as distâncias euclidianas que foram calculadas para a comparação dos pares de célula. As distâncias euclidianas foram com base na comparação das células com base nos 290 genes que foram diferentemente expressos entre os tipos de célula. A distância euclidiana é inversamente proporcional a similaridade entre a expressão dos 290 genes.

Tabela 10-2. As distâncias euclidianas para os pares de célula. A distância euclidiana foi calculada para os tipos de célula utilizando os 290 genes que foram expressos diferencialmente entre os tipos de célula. A similaridade entre as células é inversamente proporcional à distância euclidiana.

Par de célula	Distância euclidiana
ICBM-HMSC	24,71
PLACENTA-UMBILICAL	25,52
ICBM-FIBROBLASTO	36,44
ICBM-PLACENTA	37,09
FIBROBLASTO-MSC	39,63
ICBM-UMBILICAL	40,15
Fibroblasto-Umbilical	41,59
MSC-PLACENTA	42,84
MSC-UMBILICAL	46,86
ICBM-PLACENTA	48,41

[000246] As Tabelas 10-3, 10-4, e 10-5 mostram a expressão de genes

aumentada em células derivadas de placenta (Tabela 10-3), aumentada em células derivadas do cordão umbilical (Tabela 10-4), e reduzida em células derivadas do cordão umbilical e placenta (Tabela 10-5).

Tabela 10-3. Genes que são especificamente aumentados na expressão nas células derivadas de placenta quando comparado com as outras linhagens de célula ensaiadas.

Genes aumentados em células derivadas de placenta		
ID do Conjunto de Sonda	Nome do gene	Número de Acesso NCBI
209732_at	Lecitina tipo C (domínio de reconhecimento de carboidrato, dependente de cálcio), membro 2 da superfamília (induzido por ativação)	AF070642
206067_S_at	Tumor 1 de Wilms	NM_024426
207016_S_at	Família de aldeído desidrogenase 1, membro A2	AB015228
206367_at	Renina	NM_000537
210004_at	Receptor 1 de lipoproteína de baixa densidade oxidado (semelhante a lectina)	AF035776
214993_at	<i>Homo sapiens</i> , clone IMAGE:4179671, mRNA, cds parcial	AF070642
202178_at	Proteína cinase C, zeta	NM_002744
209780_at	Proteína hipotética, DKFZp564F013	AL136883
204135_at	Sub-regulado em câncer ovariano 1	NM_014890
213542_at	mRNA de <i>Homo sapiens</i> ; cDNA DKFZp547K1113 (de clone DKFZp547K1113)	AI246730

Tabela 10-4. Genes que são especificamente aumentados na expressão em células derivadas do cordão umbilical quando comparado com as outras linhagens de célula ensaiadas.

Genes aumentados em células derivadas do umbigo		
ID do Conjunto de Sonda	Nome do gene	Número de Acesso NCBI
202859_x_at	Interleucina 8	NM_000584
211506_S_at	Interleucina 8	AF043337

Genes aumentados em células derivadas do umbigo		
ID do Conjunto de Sonda	Nome do gene	Número de Acesso NCBI
210222_S_at	Reticulon 1	BC000314
204470_at	Ligante 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (atividade de estimulação de crescimento de melanoma)	NM_001511
206336_at	Ligante 6 de quimiocina (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotática de granulócito)	NM_002993
207850_at	Ligante 3 de quimiocina (motivo C-X-C)	NM_002090
203485_at	Reticulon 1	NM_021136
202644_S_at	Fator de necrose de tumor, proteína 3 alfa-induzida	NM_006290

Tabela 10-5. Genes que foram diminuídos na expressão nas células de cordão umbilical e placenta quando comparado com outras linhagens de célula ensaiadas.

Genes diminuídos em células derivadas do umbigo e placenta		
ID do Conjunto de Sonda	Nome do gene	Número de Acesso NCBI
210135_S_at	Homeobox 2 de estatura curta	AF022654,1
205824_at	Proteína 2 de 27 kDa de choque térmico	NM_001541,1
209687_at	Ligante 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (fator 1 derivado de célula estromal)	U19495,1
203666_at	Ligante 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (fator 1 derivado de célula estromal)	NM_000609,1
212670_at	elastina (estenose aórtica supravalvular, síndrome de Williams-Beuren)	AA479278
213381_at	mRNA de <i>Homo sapiens</i> ; cDNA DKFZp547K1113 (de clone DKFZp586M2022)	N91149
206201_S_at	Homeobox 2 de mesênquima (homeobox específica de interrupção do crescimento)	NM_005924,1
205817_at	Homólogo 1 de homeobox sine oculis (<i>Drosophila</i>)	NM_005982,1
209283_at	cristalina, alfa B	AF007162,1
212793_at	ativador associado desgredado de morfogênese 2	BF513244
213488_at	proteína DKFZP586B2420	AL050143,1
209763_at	similar a neuralina 1	AL049176
205200_at	Tetranectina (proteína de ligação de plasminogênio)	NM_003278,1
205743_at	domínio rico em cisteína e três homologias src (SH3)	NM_003149,1
200921_S_at	gene 1 de translocação de célula B, antiproliferativo	NM_001731,1

Genes diminuídos em células derivadas do umbigo e placenta		
ID do Conjunto de Sonda	Nome do gene	Número de Acesso NCBI
206932_at	colesterol 25-hidroxilase	NM_003956,1
204198_S_at	fator 3 de transcrição relacionado com runt	AA541630
219747_at	proteína hipotética FLJ23191	NM_024574,1
204773_at	receptor de interleucina 11, alfa	NM_004512,1
202465_at	realçador de procolágeno C-endopeptidase	NM_002593,2
203706_S_at	homólogo 7 frisado (<i>Drosophila</i>)	NM_003507,1
212736_at	Gene hipotético BC008967	BE299456
214587_at	Colágeno, Tipo VIII, alfa 1	BE877796
201645_at	Tenascina C (hexabraquiona)	NM_002160,1
210239_at	proteína 5 de iroquois homeobox	U90304,1
203903_S_at	Hefaestina	NM_014799,1
205816_at	integrina, beta 8	NM_002214,1
203069_at	glicoproteína 2 de vesículo sináptico	NM_014849,1
213909_at	<i>Homo sapiens</i> ; cDNA FLJ12280 fis, clone MAMMA1001744	AU147799
206315_at	fator 1 semelhante ao receptor de citocina	NM_004750,1
204401_at	canal ativado por cálcio de condutância pequena/intermediária de potássio, subfamília N, membro 4	NM_002250,1
216631_at	integrina, alfa 7	AK022548,1
209663_S_at	integrina, alfa 7	AF072132,1
213125_at	proteína DKFZP586L151	AW007573
202133-at	coativador transcricional com motivo de ligação de PDZ (TAZ)	AA081084
206511_S_at	homólogo 2 de homeobox sine oculis (<i>Drosophila</i>)	NM_016932,1
213435_at	proteína KIAA1034	AB028957,1
206115_at	resposta 3 de crescimento precoce	NM_004430,1
213707_S_at	homeobox 5 menos distal	NM_005221,3
218181_S_at	proteína hipotética FLJ20373	NM_017792,1
209160_at	família 1 de aldo-ceto reductase, membro C3 (3-alfa hidroxisteroide deidrogenase, tipo II)	AB018580,1
213905_X_at	Biglicano	AA845258
201261_X_at	Biglicano	BC002416,1
202132_at	coativador transcricional com motivo de ligação de PDZ (TAZ)	AA081084
214701_S_at	fibronectina 1	AJ276395,1
213791_at	Proencefalina	NM_006211,1
205422_S_at	Integrina, beta tipo 1 (com domínios de repetição tipo EGF)	NM_004791,1
214927_at	Clone de cDNA de inserção de tamanho natural de mRNA de <i>Homo sapiens</i> EUROIMAGE 1968422	AL359052,1
206070_S_at	EphA3	AF213459,1
212805_at	proteína KIAA0367	AB002365,1
219789_at	receptor C de peptídeo natriurético/guanilato ciclase C (receptor C de peptídeo atrionatriurético)	AI628360
219054_at	proteína hipotética FJL14054	NM_024563,1

Genes diminuídos em células derivadas do umbigo e placenta		
ID do Conjunto de Sonda	Nome do gene	Número de Acesso NCBI
213429_at	mRNA de <i>Homo sapiens</i> , cDNA DKFZp564B222 (de clone DKFZp564B222)	AW025579
204929_S_at	Proteína 5 de membrana associada à vesícula (miobrevina)	NM_006634,1
201843_S_at	Proteína 1 de matriz extracelular semelhante a fibulina contendo EGF	NM_004105,2
221478_at	BCL2/adenovírus E1B 19kDa interagindo com proteína tipo 3	AL132665,1
201792_at	proteína 1 de ligação de AE	NM_001129,2
204570_at	polipeptídeo 1 de subunidade VIIa de citocromo c oxidase (músculo)	NM_001864,1
201621_at	neuroblastoma, supressão de tumorigenicidade 1	NM_005380,1
202718_at	proteína 2 de ligação de fator de crescimento semelhante a insulina, 36 kDa	NM_000597,1

[000247] Tabelas 10-6, 10-7, e 10-8 mostram a expressão de genes aumentados em fibroblastos humanos (Tabela 10-6), células ICBM (Tabela 10-7), e MSCs (Tabela 10-8).

Tabela 10-6. Genes que foram aumentados em expressão em fibroblastos quando comparado com as outras linhagens de célula ensaiadas.

Genes aumentados em fibroblastos
fosfatase 2 de especificidade dual
proteína KIAA0527
cDNA <i>Homo sapiens</i> : FLJ23224 fis, clone ADSU02206
dineína, citoplásmico, polipeptídeo 1 intermediário
ancirina 3, nodo de Ranvier (ancirina G)
inibina, beta A (Activina A, activina AB alfa polipeptídeo)
ectonucleotídeo oiofosfatase/fosfodiesterase 4 (função putativa)
Proteína KIAA1053
Proteína 1A associada ao microtúbulo
Proteína 41 de dedo de zinco
Proteína HSPC019

cDNA <i>Homo sapiens</i> : FLJ23564 fis, clone LNG10773
mRNA <i>Homo sapiens</i> ; cDNA DKFZp564A072 (de clone DKFZp564A072)
proteína LIM (similar ao enigma de ligação de proteína cinase C de rato)
inibidor de realçador de gene de polipeptídeo leve de capa em células B, proteína associada ao complexo de cinase
proteína hipotética FLJ22004
sequência de mRNA humano (clone CTG-A4)
ESTs, Moderadamente similar ao fator 2 semelhante do receptor de citocina; precursor de receptor CRL2 de citocina
transformação do fator de crescimento; beta 2
proteína hipotética MGC29643
antígeno identificado por anticorpo monoclonal MRC OX-2
proteína de retinopatia ligada a X putativa

Tabela 10-7. Genes que foram aumentados na expressão nas células derivadas de ICBM quando comparados com outras linhagens de célula ensaiadas.

Genes aumentados em células ICBM
<ul style="list-style-type: none"> • proteína de repetição de ancirina cardíaca • ORF de região de classe I de MHC • integrina, alfa 10 • proteína hipotética FLJ22362 • UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina:polipeptídeo N-acetilgalactosaminil-transferase 3 (GalNAc-T3) • Proteína 44 induzida por interferon • SRY (região Y de determinação do sexo)-caixa 9 (displasia campomélica, reversão de sexo autossômica) • proteína 1-1 associada a ceratina • hipocalcina tipo 1 • denteado 1 (síndrome de Alagille) • proteogliano 1, grânulo secretor

Tabela 10-8. Genes que foram aumentados na expressão nas células

MSC quando comparado com outras linhagens de célula ensaiadas

Genes aumentados em células MSC

- interleucina 26
 - maltase-glicoamilase (alfa-glicosidase)
 - subfamília 4 de receptor nuclear, grupo A, membro 2
 - homólogo de oncogene viral de osteossarcoma de murino de v-fos FBJ
 - proteína hipotética DC42
 - subfamília 4 de receptor nuclear, grupo A, membro 2
 - homólogo B de oncogene viral de osteossarcoma de murino de FBJ
 - proteína 1 de série de reações de sinalização induzível por de WNT1
 - sequência de transformação derivada de linhagem celular MCF.2
 - canal de potássio, subfamília K, membro 15
 - homeoproteína 1 de classe pareada de cartilagem
 - CDNA de *Homo sapiens* FLJ12232 fis, clone MAMMA 1001206
 - CDNA de *Homo sapiens* FLJ34668 fis, clone LIVER2000775
 - jun B proto-oncogene
 - CLL de célula B/linfoma 6 (proteína do dedo de zinco 51)
 - proteína do dedo de zinco 36, tipo C3H, homólogo (camundongo)
-

[000248] O presente exemplo foi realizado para fornecer uma caracterização molecular das células derivadas de cordão umbilical e placenta. Esta análise incluiu células derivadas de três cordões umbilicais diferentes e três placentas diferentes. O estudo também incluiu diferentes linhagens de fibroblastos dérmicos, três linhagens de células-tronco mesenquimais, e três linhagens das células da medula óssea de crista ilíaca. O mRNA que foi expresso por estas células foi analisado em uma disposição de oligonucleotídeo GENECHIP que conteve sondas de oligonucleotídeo para 22.000 genes.

[000249] A análise revelou que as transcrições para 290 genes estavam presentes em diferentes quantidades nestes cinco tipos de célula diferentes. Estes genes incluem dez genes que são especificamente aumentados nas células derivadas de placenta e sete

genes especificamente aumentados nas células derivadas do cordão umbilical. Descobriu-se que cinquenta e quatro genes têm níveis de expressão menores em células derivadas de placenta e derivadas de tecido de cordão umbilical.

[000250] A expressão de genes selecionados foi confirmada por PCR, como mostrado no Exemplo 11. As células derivadas de pós-parto geralmente, e células derivadas do umbigo, em particular, têm perfis de expressão de gene distintos, por exemplo, quando comparado com outras células humanas, tal como as células derivadas da medula óssea e fibroblastos testados aqui.

EXEMPLO 11

Marcadores de Célula

[000251] Os perfis de expressão de gene de células derivadas de cordão umbilical humano foram comparados com aqueles de células derivadas de outras fontes utilizando um Affymetrix GENECHIP. Seis genes "assinatura" foram identificados: receptor 1 de LDL oxidado, interleucina-8 (IL-8), renina, reticulon, ligante 3 de receptor de quimiocina (ligante 3 CXC), e proteína 2 quimiotática de granulócitos (GCP-2). Estes genes de "assinatura" foram expressos em níveis relativamente elevados em células derivadas do umbigo.

[000252] Os procedimentos descritos neste exemplo foram conduzidos para verificar os dados de microdisposição e comparar os dados com expressão de gene e proteína, bem como para estabelecer uma série de ensaios seguros para detecção de identificadores únicos para células derivadas do umbigo.

[000253] As células derivadas do umbigo (quatro isolados), e fibroblastos dérmicos humanos normais (NHDF; neonatal e adulto) foram crescidas em meio de crescimento em frascos T75 revestidos com gelatina. As células-tronco mesenquimais (MSCs) foram crescidas em kit Bullet de meio de crescimento de célula-tronco mesenquimal

(MSCGM; Cambrex, Walkerville, MD).

[000254] Para experimentos com IL-8, as células foram descongeladas de nitrogênio líquido e semeadas em frascos revestidos com gelatina em 5.000 células/cm², crescidas durante 48 horas em meio de crescimento e em seguida crescidas também durante 8 horas em 10 mililitros de meio de privação de soro [baixo teor de glicose de DMEM (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina (50 Unidades/mililitro), estreptomicina (50 microgramas/mililitro)(Gibco) e 0,1% (p/v) de albumina de soro bovino (BSA; Sigma, St. Louis, MO)]. RNA foi em seguida extraído e os sobrenadantes foram centrifugados em 150 x g durante 5 minutos para remover os resíduos de célula. Os sobrenadantes foram congelados a -80°C até a análise de ELISA.

[000255] As células derivadas de tecido de cordão umbilical, bem como fibroblastos humanos derivados de prepúcio humano neonatal, foram cultivadas em meio de crescimento em frascos T75 revestidos com gelatina. As células foram congeladas na passagem 11 em nitrogênio líquido. As células foram descongeladas e transferidas para tubos centrífugos de 15 mililitros. Após a centrifugação em 150 x g durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 4 mililitros de meio de cultura e contadas. As células foram crescidas em um frasco de 75 cm² contendo 15 mililitros de meio de crescimento em 375.000 célula/frasco durante 24 horas. O meio foi mudado para um meio de privação de soro durante 8 horas. O meio de privação de soro foi coletado no final da incubação, centrifugado em 14.000 x g durante 5 minutos e armazenado em -20°C.

[000256] Para estimar o número de células em cada frasco, 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA) foram adicionados a cada frasco. Após as células desprenderem do frasco, a atividade de tripsina foi neutralizada com 8 mililitros de meio de crescimento. As células foram transferidas para um tubo centrífugo de 15 mililitros e

centrifugadas em 150 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido e 1 mililitro de meio de crescimento foi adicionado a cada tubo para ressuspender as células. O número de célula foi determinado com um hemocítômetro.

[000257] A quantidade de IL-8 secretada pelas células no meio de privação de soro foi analisada utilizando os ensaios ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todos os ensaios foram conduzidos de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

[000258] O RNA foi extraído de fibroblastos e células derivadas de cordão umbilical confluyente, ou para a expressão de IL-8, de células tratadas como descrito acima. As células foram lisadas com 350 microlitros de tampão RLT contendo beta-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO) de acordo com as instruções do fabricante (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA). O RNA foi extraído de acordo com as instruções do fabricante (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA) e submetido ao tratamento com DNase (2,7 Unidades/amostra) (Sigma St. Louis, MO). RNA foi eluído com 50 microlitros de água tratada com DEPC e armazenado a -80°C. O RNA foi também extraído de cordão umbilical humano. O tecido (30 miligramas) foi suspenso em 700 microlitros de tampão RLT contendo beta-mercaptoetanol. As amostras foram mecanicamente homogeneizadas e a extração de RNA prosseguiu de acordo com a especificação do fabricante. O RNA foi extraído com 50 microlitros de água tratada com DEPC e armazenado a -80°C.

[000259] O RNA foi transcrito reverso utilizando hexâmetros aleatórios com os reagentes de transcrição reversa TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 60 minutos, e 95°C durante 10 minutos. As amostras foram armazenadas a -20°C.

[000260] Os genes identificados por microdisposição de cDNA como unicamente regulado em células do cordão umbilical (genes de assinatura-incluindo receptor de LDL oxidado, interleucina-8, renina, e

reticulon), foram também investigados utilizando PCR em tempo real e convencional.

[000261] PCR foi realizado em amostras de cDNA utilizando os produtos de expressão de gene vendidos sob o nome comercial produtos de expressão de gene Assays-on-Demand (Applied Biosystems). O receptor de LDL oxidado (Hs00234028); renina (Hs00166915); reticulon (Hs00382515); ligante 3 de CXC (Hs00171061); GCP-2 (Hs00605742); IL-8 (Hs00174103); e GAPDH foram misturados com mistura master de PCR e cDNA TaqMan Universal de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems) utilizando um sistema de detecção de sequência 7000 com software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems). As condições de ciclo térmicas foram inicialmente 50°C durante 2 minutos e 95°C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto. Os dados de PCR foram analisados de acordo com as especificações do fabricante (User Bulletin nº 2 de Applied Biosystems for ABI Prism 7700 Sequence Detection System).

[000262] O PCR convencional foi realizado utilizando um ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, MA) para confirmar os resultados de PCR em tempo real. O PCR foi realizado utilizando 2 microlitros de solução de cDNA (1x Taq polimerase (nome comercial AMPLITAQ GOLD) tampão de reação de PCR de mistura universal (Applied Biosystems) e desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos. A amplificação foi otimizada para cada conjunto de iniciador. Para IL-8, ligante 3 CXC, e reticulon (94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos e 72°C durante 30 segundos para 30 ciclos); para renina (94°C durante 15 segundos, 53°C durante 15 segundos e 72°C durante 30 segundos para 38 ciclos); para receptor de LDL oxidado e GAPDH (94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos e 72°C durante 30 segundos para 33 ciclos). Os iniciadores utilizados para amplificação

são listados na Tabela 11-1. A concentração de iniciador na reação de PCR final foi 1 micromolar exceto para GAPDH que foi 0,5 micromolar. Os iniciadores de GAPDH foram os mesmos como para PCR em tempo real, exceto que a sonda TaqMan do fabricante não foi adicionada a reação de PCR final. As amostras foram separadas em 2% (p/v) de gel agarose e manchadas com brometo de etídio (Sigma, St. Louis, MO). As imagens foram capturadas em película 667 (Universal Twinpack, VWR International, South Plainfield, NJ) utilizando câmera de comprimento focal fixo POLAROID (VWR International, South Plainfield, NJ).

Tabela 11-1: Iniciadores Utilizados

a.	Nome dos Iniciadores	Iniciadores
Receptor LDL oxidado	S: 5'-GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3'	(SEQ ID Nº:1)
	A: 5'-AGAATGGAAAAGTGGAAATAGG-3'	(SEQ ID Nº:2)
Renina	S: 5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC-3'	(SEQ ID Nº:3)
	A: 5'-GAATTCTCGGAATCTCTGTIG-3'	(SEQ ID Nº:4)
Reticulon	S: 5'-TTACAAGCAGTGCAGAAAACC-3'	(SEQ ID Nº:5)
	A: 5'-AGTAAACATTGAAACCACAGCC-3'	(SEQ ID Nº:6)
Interleucina-8	S: 5'-TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3'	(SEQ ID Nº:7)
	A: 5'-CTTCAAAAAGTTCTCCACAACC-3'	(SEQ ID Nº:8)
Ligante 3 de quimiocina (CXC)	S: 5'-CCCACGCCACGCTCTCC-3'	(SEQ ID Nº:9)
	A: 5'-TCCTGTCAGTTGGTGCTCC-3'	(SEQ ID Nº:10)

[000263] As células derivadas do cordão umbilical foram fixadas com 4% (p/v) de paraformaldeído frio (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) durante 10 minutos em temperatura ambiente. Um isolado de cada das células derivadas do cordão umbilical na passagem 0 (P0) (diretamente após o isolamento) e passagem 11 (P11) (dois isolados de células derivadas de cordão umbilical) e fibroblastos (P11) foram utilizados. A imunocitoquímica foi realizada utilizando anticorpos direcionados contra os seguintes epitopos: vimentina (1:500, Sigma, St. Louis, MO), desmina (1:150; Sigma – aumentado contra coelho; ou 1:300; Chemicon, Temecula, CA – aumentado contra camundongo), alfa-actina de músculo liso (SMA; 1:400; Sigma), citoceratina 18 (CKI 8;

1:400; Sigma), Fator von Willebrand (vWF; 1:200; Sigma), e CD34 (CD34 humano Classe III; 1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, CA). Além disso, os seguintes marcadores foram testados na passagem 11 de células derivadas de cordão umbilical: GROalfa anti-humano-PE (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), GCP-2 anti-humano (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), receptor 1 de LDL oxidado anti-humano (ox-LDL RI; 1:100; Santa Cruz Biotech), e NOGA-A anti-humano (1 :100; Santa Cruz, Biotech).

[000264] As culturas foram lavadas com salina tamponada de fosfato (PBS) e expostas a uma solução de bloqueio de proteína contendo PBS, 4% (v/v) de soro de cabra (Chemicon, Temecula, CA), e 0,3% (v/v) de Triton (Triton X-100; Sigma, St. Louis, MO) durante 30 minutos para acessar os antígenos intracelulares. Onde o epítipo de interesse foi localizado na superfície de célula (CD34, ox-LDL RI), Triton X-100 foi omitido em todas as etapas do procedimento para prevenir perda de epítipo. Além disso, em casos onde o anticorpo primário foi aumentado contra cabra (GCP-2, ox-LDL RI, NOGO-A), 3% (v/v) de soro de asno foi utilizado no lugar de soro de cabra em todo o processo. Os anticorpos primários, diluídos em solução de bloqueio, foram em seguida aplicados às culturas durante um período de 1 hora em temperatura ambiente. As soluções de anticorpo primárias foram removidas e as culturas foram lavadas com PBS antes da aplicação de soluções de anticorpo secundárias (uma hora em temperatura ambiente) contendo bloqueio junto com IgG anticamundongo de cabra- Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) e/ou IgG anticoelho de cabra- Alexa 488 (1:250; Molecular Probes) ou IgG anticabra de asno-FITC (1:150, Santa Cruz Biotech). As culturas foram em seguida lavadas e 10 micromolares de DAPI (Molecular Probes) aplicados durante 10 minutos para visualizar os núcleos da célula.

[000265] Em seguida ao imunomanchamento, a fluorescência foi

visualizado utilizando um filtro de fluorescência apropriado em um microscópio epi-fluorescente invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). Em todos os casos, o manchamento positivo representou sinal de fluorescência acima do manchamento de controle onde o procedimento total descrito acima foi seguido com a exceção de aplicação de uma solução de anticorpo primária (sem o 1° controle). As imagens representativas foram capturadas utilizando uma videocâmera de cor digital e software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para amostras triplamente manchadas, cada imagem foi tomada utilizando somente um filtro de emissão de cada vez. As montagens em camadas foram então preparadas utilizando software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

[000266] As células aderentes nos frascos foram lavadas em salina tamponada de fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) e desprendidas com Tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). As células foram colhidas, centrifugadas, e ressuspensas em 3% (v/v) de FBS em PBS em uma concentração de célula de 1×10^7 /mililitro. Alíquotas de cem microlitros foram liberadas para os tubos cônicos. As células manchadas para antígenos intracelulares foram permeabilizadas com tampão Perm/de lavagem (BD Pharmingen, San Diego, CA). O anticorpo foi adicionado às alíquotas como pelas especificações do fabricante, e as células foram incubadas no escuro durante 30 minutos a 4°C. Após incubação, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas para remover o anticorpo em excesso. As células requerendo um anticorpo secundário foram ressuspensas em 100 microlitros de 3% de FBS. O anticorpo secundário foi adicionado como pela especificação do fabricante, e as células foram incubadas no escuro durante 30 minutos a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas para remover o anticorpo secundário em excesso. As células lavadas foram ressuspensas em 0,5 mililitro de PBS e analisada por citometria de fluxo.

Os seguintes anticorpos foram utilizados: receptor 1 de LDL oxidado (sc-5813; Santa Cruz, Biotech), GROa (555042; BD Pharmingen, Bedford, MA), IgG de Camundongo capa, (P-4685 e M-5284; Sigma), e IgG de cabra contra asno (sc-3743; Santa Cruz, Biotech.). Análise de citometria de fluxo foi realizada com FACScalibur (Becton Dickinson San Jose, CA).

[000267] Os resultados de PCR em tempo real para genes de "assinatura" selecionados realizado em cDNA de células derivadas de cordão umbilical humano, fibroblastos de adulto e neonatal, e células-tronco mesenquimais (MSCs) indicam que ambas expressões de receptores de reticulon e LDL oxidado foram mais elevadas em células derivadas do umbigo quando comparado com as outras células. Os dados obtidos de PCR em tempo real foram analisados pelo método $\Delta\Delta CT$ e expressos em uma escala logarítmica. Nenhuma diferença significativa nos níveis de expressão de ligante 3 de CXC e GCP-2 foi encontrada entre as células de pós-parto e controles. Os resultados de PCR em tempo real foram confirmados por PCR convencional. O sequenciamento de produtos de PCR também validou estas observações. Nenhuma diferença significativa no nível de expressão de ligante 3 de CXC foi encontrado entre as células de pós-parto e os controles utilizando iniciadores de ligante 3 de CXC de PCR convencional listados na Tabela 11-1.

[000268] A expressão da citocina, IL-8 em células derivadas de tecido de cordão umbilical foi elevada em ambas as células cultivadas em meio de crescimento e privadas de soro derivadas de tecido de cordão umbilical. Todos os dados de PCR de tempo real foram validados com PCR convencional e por sequenciamento dos produtos de PCR.

[000269] Após o crescimento nos meios livres de soro, os meios condicionados foram examinados quanto à presença de IL-8. As quantidades maiores de IL-8 foram detectadas em meios nos quais as

células do umbigo foram crescidas (Tabela 11-2). Nenhuma IL-8 foi detectada no meio no qual os fibroblastos dérmicos humanos foram crescidos.

Tabela 11-2: Expressão de proteína IL-8 medida por ELISA

Tipo de célula	IL-8
Fibroblastos humanos	ND
Isolado de Placenta 1	ND
Isolado UMBC 1	2058,42 ± 144,67
Isolado de Placenta 2	ND
Isolado UMBC 2	2368,86 ± 22,73
Isolado de Placenta 3 (normal O ₂)	17,27 ± 8,63
Isolado de Placenta 3 (O ₂ baixo, W/O BME)	264,92 ± 9,88
Os resultados do ensaio ELISA para interleucina-8 (IL-8) realizados nas células derivadas do cordão umbilical e placenta bem como fibroblastos de pele humana. Os valores são apresentados aqui como picograma/milhão de células, n=2 sem N.D. = Não Detectado	

[000270] As células derivadas do cordão umbilical humano na passagem 0 foram sondadas para a produção de proteínas selecionadas por análise imunocitoquímica. Imediatamente após o isolamento (passagem 0), as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído e expostas aos anticorpos para seis proteínas: Fator de von Willebrand, CD34, citoceratina 18, desmina, alfa-actina de músculo liso, e vimentina. As células derivadas de cordão umbilical foram positivas para alfa-actina de músculo liso e vimentina, com o padrão de mancha consistente através da passagem 11.

[000271] A produção de GROalfa, GCP-2, receptor 1 de LDL oxidado e reticulon (NOGO-A) em células derivadas de cordão umbilical na passagem 11 foi investigada por imunocitoquímica. As células derivadas de cordão umbilical foram GCP-2 positivo, porém a produção de GRO alfa não foi detectada por este método. Além disso, as células foram NOGO-A positivo.

[000272] O acordo entre os níveis de expressão de gene medidos por microdisposição e PCR (tanto convencional quanto em tempo real) foi

estabelecido para quatro genes: receptor 1 de LDL oxidado, renina, reticulon, e IL-8. A expressão destes genes foi diferencialmente regulada no nível de mRNA nas células derivadas de cordão umbilical, com IL-8 também diferencialmente regulada no nível de proteína. A expressão diferencial de GCP-2 e ligante 3 de CXC não foi confirmada no nível de mRNA. Embora este resultado não suporte os dados originalmente obtidos do experimento de microdisposição, isto pode ser devido a uma diferença na sensibilidade das metodologias.

[000273] As células derivadas do cordão umbilical humano na passagem 0 foram sondadas para a expressão de alfa-actina de músculo liso e vimentina, e foram positivas para ambas. O padrão de manchamento foi conservado através da passagem 11.

[000274] Em conclusão, os dados de mRNA completo pelo menos parcialmente verificam os dados obtidos dos experimentos de microdisposição.

EXEMPLO 12

Caracterização Imuno-histoquímica de Fenótipos Celulares

[000275] Os fenótipos de células encontrados em tecido de cordão umbilical humano foram analisados por imuno-histoquímica.

[000276] O tecido de cordão umbilical humano foi colhido e fixado por imersão em 4% (p/v) de paraformaldeído durante a noite a 4°C. A imuno-histoquímica foi realizada utilizando anticorpos direcionados contra os seguintes epitopos (vide, Tabela 12-1): vimentina (1:500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1:150, aumentado contra coelho; Sigma; ou 1:300, aumentado contra camundongo; Chemicon, Temecula, CA), alfa-actina de músculo liso (SMA; 1 :400; Sigma), citoqueratina 18 (CKI 8; 1:400; Sigma), Fator de von Willebrand (vWF; 1:200; Sigma), e CD34 (Casse III de CD34 humano; 1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, CA). Além disso, os seguintes marcadores foram testados: GROalfa-PE anti-humano (1:100; Becton

Dickinson, Franklin Lakes, NJ), GCP-2 anti-humano (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), receptor 1 de LDL oxidado anti-humano (ox-LDL RI; 1:100; Santa Cruz Biotech), e NOGO-A anti-humano (1:100; Santa Cruz Biotech). Os espécimes fixos foram aparados com um bisturi e colocados em composto embebido de OCT (Tissue- Tek OCT; Sakura, Torrance, CA) em um banho de gelo seco contendo etanol. Os blocos congelados foram em seguida seccionados (10 microns e espessura) utilizando um criostato padrão (Leica Microsystems) e montados em lâminas de vidro para manchaemento.

[000277] Imuno-histoquímica foi realizada similar aos estudos prévios. (Por exemplo, Messina e outros, *Exper. Neurol*, 2003; 184: 816-829). As seções de tecido foram lavadas com salina tamponada de fosfato (PBS) e expostas a uma solução de bloqueio de proteína contendo PBS, 4% (v/v) de soro de cabra (Chemicon, Temecula, CA), e 0,3% (v/v) de Triton (Triton X-100; Sigma) durante uma hora para acessar os antígenos intracelulares. Em casos onde o epitopo de interesse seria localizado na superfície da célula (CD34, ox-LDL RI), triton foi omitido em todas as etapas do procedimento para prevenir a perda de epitopo. Além disso, em casos onde o anticorpo primário foi aumentado contra cabra (GCP-2, ox-LDL RI, NOGO-A), 3% (v/v) de soro de asno foi utilizado no lugar de soro de cabra em todo o procedimento. Os anticorpos primários, diluídos em solução de bloqueio, foram em seguida aplicados às seções, durante um período de 4 horas em temperatura ambiente. As soluções de anticorpo primário foram removidas, e as culturas lavadas com PBS antes da aplicação de soluções de anticorpo secundário (1 hora em temperatura ambiente) contendo bloco junto com exas Red de IgG-T anticamundongo de cabra (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) e/ou IgG-Alexa 488 antioelho de cabra (1:250; Molecular Probes) ou IgG-FITC anticabra de asno (1:150; Santa Cruz Biotech). As culturas foram lavadas, e 10 micromolares de DAPI (Molecular Probes) foram

aplicados durante 10 minutos para visualizar os núcleos da célula.

[000278] Em seguida ao imunomanchamento, a fluorescência foi visualizada utilizando o filtro de fluorescência apropriado em um microscópio epifluorescente invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). O manchamento positivo foi representado por sinal de fluorescência acima do manchamento de controle. As imagens representativas foram capturadas utilizando uma videocâmera de cor digital e software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para amostras de manchas triplas, cada imagem foi tomada utilizando somente um filtro de emissão de cada vez. As montagens em camada foram em seguida preparadas utilizando software Adobe Photoshop software (Adobe, San Jose, CA).

Tabela 12-1: Sumário dos Anticorpos Primários Utilizados

Anticorpo	Concentração	Vendedor
Vimentina	1:500	Sigma, St. Louis, MO
Desmina (rb)	1:150	Sigma
Desmina (m)	1:300	Chemicon, Temecula, CA
alfa-actina de músculo liso (SMA)	1:400	Sigma
Citoqueratina 18 (CK18)	1:400	Sigma
fator de von Willebrand (vWF)	1:200	Sigma
CD34 III	1:100	DakoCytomation, Carpinteria, CA
GROalfa-PE	1:100	BD, Franklin Lakes, NJ
GCP-2	1:100	Santa Cruz Biotech
Ox-LDL R1	1:100	Santa Cruz Biotech
NOGO-A	1:100	Santa Cruz Biotech

[000279] Os marcadores de vimentina, desmina, SMA, CK18, vWF, e CD34 foram expressos em um subgrupos das células encontradas no cordão umbilical (dados não mostrados). Em particular, as expressões

de vWF e CD34 foram restritas aos vasos sanguíneos contidos no cordão. As células CD34+ ficaram na camada mais interna (lado do lúmen). A expressão de vimentina foi encontrada em toda a matriz e os vasos sanguíneos do cordão. SMA foi limitado à matriz e as paredes externas da artéria e veia, porém não contido nos vasos sozinhos. CK18 e desmina foram observados nos vasos sozinhos, desmina sendo restrita às camadas do meio e externas.

[000280] Nenhum destes marcadores foi observado no cordão umbilical (dados não mostrados).

[000281] Vimentina, desmina, alfa-actina de músculo liso, citoqueratina 18, Fator de von Willebrand, e CD 34 são expressos em células em cordão umbilical humano. Com base nos estudos de caracterização *in vitro* mostrando que somente vimentina e alfa-actina de músculo liso são expressos, os dados sugerem que o processo corrente de isolamento de célula derivada do cordão umbilical colhe uma subpopulação de células ou que as células isoladas mudam a expressão de marcadores para expressar vimentina e alfa-actina de músculo liso.

EXEMPLO 13

Secreção de Fatores Tróficos

[000282] A secreção de fatores tróficos selecionados de células derivadas do umbigo foi medida. Os fatores foram selecionados os quais têm atividade angiogênica, por exemplo, fator de crescimento de hepatócito (HGF) (Rosen e outros, Ciba Found. Symp., 1997; 212:215-26); proteína 1 quimiotática de monócito (MCP-I) (Salcedo e outros, Blood, 2000; 96:34-40); interleucina-8 (IL-8) (Li e outros, J. Immunol., 2003; 170:3369-76); fator de crescimento de ceratinócito (KGF); fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF); fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Hughes e outros, Ann. Thorac. Surg. 2004; 77:812-8); inibidor 1 de tecido de metaloproteinase de matriz (TIMPI);

angiopoietina 2 (ANG2); fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGFbb); trombopoietina (TPO); fator de crescimento epidérmico de ligação de heparina (HB-EGF); fator 1 alfa derivado de estromal (SDF-1 alfa), atividade neurotrófica/neuroprotetora (fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF) (Cheng e outros, Dev. Biol., 2003; 258;319-33); interleucina-6 (IL-6); proteína-2 quimiotática de granulócito (GCP-2); fator beta2 de crescimento transformador (TGFbeta2)); ou atividade de quimiocina (proteína 1 alfa inflamatória de macrófago (MIP1 alfa); proteína 1 beta inflamatória de macrófago (MIP1beta); quimioatraente-1 de monócito (MCP-1); Rantes (regulado na ativação, célula T normal expressa ou secretada); 1309; quimiocina regulada por ativação e timo (TARC); Eotaxina; quimiocina derivada de macrófago (MDC); e (IL-8).

[000283] As células derivadas de cordão umbilical, bem como fibroblastos humanos derivados de prepúcio humano neonatal, foram cultivadas em meio de crescimento em frascos T75 revestidos com gelatina. As células foram crioconservadas na passagem 11 e armazenadas em nitrogênio líquido. Após o descongelamento, o meio de crescimento foi adicionado às células, seguido por transferência para um tubo centrífugo de 15 mililitros e centrifugação das células em 150 x g durante 5 minutos. O pélete de célula foi ressuspensão em 4 mililitros de meio de crescimento, e as células foram contadas. As células foram semeadas em 5.000 células/cm² em frascos T75 cada contendo 15 mililitros de meio de crescimento, e cultivadas durante 24 horas. O meio foi mudado para um meio livre de soro (baixo teor de glicose de DMEM (Gibco), 0,1% (peso/v) de albumina de soro bovino (Sigma), penicilina (50 Unidades/mililitro) e estreptomicina (50 microgramas/mililitro, Gibco)) durante 8 horas. O meio livre de soro condicionado foi coletado no final da incubação por centrifugação em 14.000 x g durante 5 minutos e armazenado a -20°C.

[000284] Para estimar o número de células em cada frasco, as células

foram lavadas com salina tamponada de fosfato (PBS) e desprendidas utilizando 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco). A atividade de tripsina foi inibida pela adição de 8 mililitros de meio de crescimento. As células foram centrifugadas em 150 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido, e as células foram ressuspensas em 1 mililitro de Meio de crescimento. O número de célula foi estimado com um hemocítômetro.

[000285] As células foram crescidas a 37°C em 5% de dióxido de carbono e oxigênio atmosférico. A quantidade de MCP-1, IL-6, VEGF, SDF-1alfa, GCP-2, IL-8, e TGF-beta2 produzidos por cada amostra de célula foi determinada por ELISA (R&D Systems, Minneapolis, Mn.). Todos os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Os valores apresentados são picogramas por mililitro por milhão de células (n=2, sem).

[000286] As quimiocinas (MIP1alfa, MIP1beta, MCP-1, Rantes, 1309, TARC, Eotaxin, MDC, IL8), BDNF, e fatores angiogênicos (HGF, KGF, bFGF, VEGF, TIMPI, ANG2, PDGFbb, TPO, HB-EGF foram medidos utilizando Disposições Searchlight Proteome (Pierce Biotechnology Inc.). As disposições de proteoma são ELISAs sanduíches multiplexados para a medição quantitativa de duas a dezesseis proteínas por poço. As disposições são produzidas manchando-se um padrão de 2 x 2, 3 x 3, ou 4 x 4 de quatro a dezesseis anticorpos de captura diferentes em cada poço de uma placa de 96 poços. Em seguida a um procedimento ELISA sanduíche, a placa total é imageada para capturar o sinal quimioluminescente gerado em cada ponto em cada poço da placa. O sinal gerado em cada ponto é proporcional à quantidade de proteína-alvo na amostra ou padrão original.

[000287] MCP-1 e IL-6 foram secretados por PPDCs derivados de umbigo e fibroblastos dérmicos (Tabela 13-1). SDF-1alfa e GCP-2 foram secretados por fibroblastos. GCP-2 e IL-8 foram secretados por PPDCs derivados de umbigo. TGF-beta2 não foi detectado de qualquer tipo de

célula por ELISA.

Tabela 13-1. Resultados de ELISA: Detecção de Fatores tróficos

	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1	GCP-2	IL-8	TGF-beta
Fibroblasto	17±1	61±3	29±2	19±1	21±1	ND	ND
Umbilical(022803)	1150±74	4234±289	ND	ND	160±11	2058±145	ND
Umbilical(071003)	2794±84	1356±43	ND	ND	2184±98	2369±23	ND

[000288] Ensaio ELISA Multiplexado de Searchlight®. TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1beta, MCP1, RANTES, I309, TARC, MDC, e IL-8 foram secretados de PPDCs derivados de umbigo (Tabelas 13-2 e 13-3). Nenhum Ang2, VEGF, ou PDGFbb foi detectado.

Tabela 13-2. Resultados do ensaio ELISA Multiplexado de Searchlight®

	TIMP1	ANG2	PDGFbb	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF	BDNF
hFB	19306,3	ND	ND	230,5	5,0	ND	ND	27,9	1,3	ND
U1	57718,4	ND	ND	1240,0	5,8	559,3	148,7	ND	9,3	165,7
U3	21850,0	ND	ND	1134,5	9,0	195,6	30,8	ND	5,4	388,6

Código: hFB (fibroblastos humanos), U1 (PPDC derivado do umbigo (022803)), U3 (PPDC derivado do umbigo (071003)).

ND: Não Detectado.

Tabela 13-3. Resultados do ensaio ELISA Multiplexado de Searchlight®

	MIP1a	MIP1b	MCP1	RANTES	I309	TARC	Eotaxin	MDC	IL8
hFB	ND	ND	39,6	ND	ND	0,1	ND	ND	204,9
U1	ND	8,0	1694,2	ND	22,4	37,6	ND	18,9	51930,1
U3	ND	5,2	2018,7	41,5	11,6	21,4	ND	4,8	10515,9

Código: hFB (fibroblastos humanos), U1 (PPDC derivado do umbigo (022803)), U3 (PPDC derivado do umbigo (071003)).

ND: Não Detectado.

[000289] As células derivadas do umbigo segregaram vários fatores tróficos. Alguns destes fatores tróficos, tais como HGF, bFGF, MCP-1 e IL-8, desempenham papéis importantes na angiogênese. Outros fatores tróficos, tais como BDNF e IL-6, têm fatores importantes na proteção ou regeneração neural.

EXEMPLO 14

Imunologia *In vitro*

[000290] Linhagens celulares do cordão umbilical foram avaliadas *in vitro* para suas características imunológicas em um esforço para prognosticar a resposta imunológica, se houver, estas células eliciariam no transplante *in vivo*. Linhagens celulares pós-parto foram avaliadas por citometria de fluxo para a expressão de HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86, e B7-H2. Estas proteínas são expressas por células de apresentação de antígeno (APC) e são requeridas para a estimulação direta de células CD4⁺ T que não receberam tratamento (Abbas & Lichtman, Cellular and Molecular Immunology, 5^a Ed. (2003) Saunders, Philadelphia, p. 171). As linhagens celulares foram também analisadas por citometria de fluxo para a expressão de HLA-G (Abbas & Lichtman, supra); CD 178 (Coumans e outro, *Journal of Immunological Methods*, 1999; 224: 185-196); e PD-L2 (Abbas & Lichtman, supra; Brown e outro, *The Journal of Immunology*, 2003; 170: 1257-1266). Para prognosticar a extensão a qual as linhagens celulares derivadas de umbigo pós-parto eliciaram uma resposta imune *in vivo*, as linhagens celulares foram testadas em uma reação de linfócito misturada unidirecional (MLR).

[000291] As células foram cultivadas em meio de crescimento em frascos T75 (Corning, Corning, NY) revestidos com 2% de gelatina (Sigma, St. Louis, MO) até que confluentes.

[000292] As células foram lavadas com solução salina tamponada por fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) e separadas com Tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, MO). As células foram colhidas, centrifugadas, e ressuspensas em 3% (v/v) de FBS em PBS em uma concentração de célula de 1×10^7 por mililitro. Anticorpo (Tabela 14-1) foi adicionado a cem microlitros de suspensão celular de acordo com as especificações do fabricante e incubado no escuro durante 30 minutos a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas para remover o anticorpo não ligado. As células foram ressuspensas em 500 microlitros de PBS e analisadas por citometria de fluxo usando um

instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Tabela 14-1. Anticorpos

Anticorpo	Fabricante	Número do catálogo
HLA-DR,DP,DQ	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555558
CD80	BD Pharmingen	557227
CD86	BD Pharmingen	555665
B7-H2	BD Pharmingen	552502
HLA-G	Abcam (Cambridgeshire, UK)	ab 7904-100
CD178	Santa Cruz (San Cruz, CA)	sc-19681
PD-L2	BD Pharmingen	557846
Camundongo IgG2alfa	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
Camundongo IgG1kappa	Sigma	P-4685

[000293] Frascos criopreservados de PPDC derivadas de umbigo de passagem 10 rotulados como linhagem celular "A" foram empacotados em gelo seco e enviados para CTBR (Senneville, Quebec) para conduzir uma reação de linfócito misturada usando CTBR SOP n. CAC-031. Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram coletadas de múltiplos doadores voluntários masculinos e femininos. Seis doadores de sangue voluntários humanos foram avaliados para identificar um único doador alogeneico que exibiu uma resposta à proliferação forte em uma reação de linfócito misturada com os outros cinco doadores de sangue. Este doador foi selecionado como os outros cinco doadores de sangue. Este doador foi selecionado como o doador de controle positivo alogeneico. Os cinco doadores de sangue restantes foram selecionados como recipientes. PBMC alogeneica de estimulador (doador), PBMC alogeneica, PBMC autóloga, e linhagens celulares pós-parto foram tratados com mitomicina C. Células estimuladoras tratadas com mitomicina C e autólogas foram adicionadas aos PBMCs respondedores (recipientes) e cultivadas durante 4 dias. Depois da incubação, [³H]timidina foi adicionada a cada amostra e cultivada durante 18 horas. Após a colheita das células, o DNA radiorrotulado foi extraído, e a incorporação de [³H]-timidina foi medida usando um contador de cintilação. As reações foram realizadas em triplicata usando

placas de cultura de duas células com três receptores por placa.

[000294] O índice de excitação para o doador alogeneico (SIAD) foi calculado como a proliferação média do receptor mais doador alogeneico tratado com mitomicina C dividido pela proliferação de referência do receptor. O índice de excitação das células pós-parto foi calculado como a proliferação média do receptor mais linhagem celular pós-parto tratada com mitomicina C dividido pela proliferação de referência do receptor.

[000295] Seis doadores de sangue voluntários humanos foram avaliados para identificar um único doador alogeneico que eliciará uma resposta à proliferação forte em uma reação de linfócito misturada com os outros cinco doadores de sangue. Este doador foi selecionado como o doador de controle positivo alogeneico. Os cinco doadores de sangue restantes foram selecionados como recipientes. As linhagens celulares derivadas de cordão umbilical e de doador de controle positivo alogeneico foram tratadas com mitomicina C e cultivadas em uma reação de linfócito misturada com os cinco receptores alogeneicos individuais. As reações foram realizadas em triplicata usando duas placas de cultura de célula com três receptores por placa (Tabela 14-2). O índice de estimulação médio variou de 6,5 (placa 1) para 9 (placa 2) e os controles positivos de doador alogeneico variaram de 42,75 (placa 1) para 70 (placa 2) (Tabela 14-3).

Tabela 14-2. Dados de Reação de Linfócito Misturados – Linhagem Celular A (Cordão Umbilical)

DPM para Ensaio de Proliferação

Placa ID: Placa 1

Número analítico	Sistema de Cultura	Replicações			Meio	SD	CV
		1	2	3			
IM04-2478	Linha de Base de proliferação do receptor	1074	406	391	623,7	390,07	62,5
	Controle de autoestimulação (células autólogas tratadas com Mitomicina C)	672	510	1402	861,3	475,19	55,2
	Doador alogeneico de MLR IM04-2477 (tratado com Mitomicina C)	43777	48391	38231	43466,3	5087,12	11,7
	MLR com linhagem celular (Célula tratada com mitomicina C tipo A)	2914	5622	6109	4881,7	1721,36	35,3
SI (doador)					70		
SI (Linhagem celular)					8		
IM04-2479	Linha de Base de proliferação do receptor	530	508	527	521,7	11,93	2,3
	Controle de autoestimulação (células autólogas tratadas com Mitomicina C)	701	567	1111	793,0	283,43	35,7
	Doador alogeneico de MLR IM04-2477 (tratado com Mitomicina C)	25593	24732	22707	24344,0	1481,61	6,1
	MLR com linhagem celular (Célula tratada com mitomicina C tipo A)	5086	3932	1497	3505,0	1832,21	52,3
SI (doador)					47		
SI (Linhagem celular)					7		

122/128

Número analítico	Sistema de Cultura	Replicações			Meio	SD	CV
		1	2	3			
IM04-2480	Linha de Base de proliferação do receptor	1192	854	1330	1125,3	244,90	21,8
	Controle de autoestimulação (células autólogas tratadas com Mitomicina C)	2963	993	2197	2051,0	993,08	48,4
	Doador alogeneico de MLR IM04-2477 (tratado com Mitomicina C)	25416	29721	23757	26298,0	3078,27	11,7
	MLR com linhagem celular (Célula tratada com mitomicina C tipo A)	2596	5076	3426	3699,3	1262,39	34,1
SI (doador)					23		
SI (Linhagem celular)					3		
IM04-2481	Linha de Base de proliferação do receptor	695	451	555	567,0	122,44	21,6
	Controle de autoestimulação (células autólogas tratadas com Mitomicina C)	738	1252	464	818,0	400,04	48,9
	Doador alogeneico de MLR IM04-2477 (tratado com Mitomicina C)	13177	24885	15444	17835.3	62-0.52	34,8
	MLR com linhagem celular (Célula tratada com mitomicina C tipo A)	4495	3671	4674	4280,0	534,95	12,5
SI (doador)					31		
SI (Linhagem celular)					8		

Placa ID: Placa 2

Número analítico	Sistema de Cultura	Replicações			Meio	SD	CV
		1	2	3			
IM04-2482	Linha de Base de proliferação do receptor	432	533	274	413,0	130,54	31,6
	Controle de autoestimulação (células autólogas tratadas com Mitomicina C)	1459	633	598	896,7	487,31	54,3
	Doador alogeneico de MLR IM04-2477 (tratado com Mitomicina C)	24286	3-823	31346	28818,3	3933,82	13,7
	MLR com linhagem celular (Célula tratada com mitomicina C tipo A)	2762	1502	6723	3662,3	2724,46	74,4
SI (doador)					70		
SI (Linhagem celular)					9		
IM04-2477 (Doador alogeneico)	Linha de Base de proliferação do receptor	312	419	349	360,0	54,34	15,1
	Controle de autoestimulação (células autólogas tratadas com Mitomicina C)	567	604	374	515,0	123,50	24,0
Linhagem celular tipo A	Linha de Base de proliferação do receptor	5101	3735	2973	3936,3	1078,19	27,4
	Controle de autoestimulação (células autólogas tratadas com Mitomicina C)	1924	4570	2153	2882,3	1466,04	509

124/128

Tabela 14-3. Índice de estimulação médio de células umbilicais e um doador alogeneico em uma reação de linfócito misturada com cinco receptores alogeneicos individuais.

Índice de Estimulação Médio

	Recipiente	Umbigo
Placa 1 (receptores 1-4)	42,75	6,5
Placa 2 (receptor 5)	70	9

[000296] Histogramas de células derivadas de cordão umbilical analisadas por citometria de fluxo mostram a expressão negativa de HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86, e B7-H2, como notado por valor de fluorescência consistente com o controle de IgG, indicando que as linhagens celulares derivadas de cordão umbilical necessitam das moléculas de superfície de célula exigidas para diretamente estimular as PBMCs alogeneicas (por exemplo, células CD4+ T).

[000297] As células umbilicais analisadas por citometria de fluxo foram positivas para expressão de PD-L2, como refletido no aumento na fluorescência relativa ao controle de IgG. As células foram negativas para expressão de CD 178 e HLA-G, como notado por valores de fluorescência consistentes com o controle de IgG.

[000298] Nas reações de linfócito misturadas conduzidas com linhagens celulares derivadas de cordão umbilical, o índice de estimulação médio variou de 6,5 para 9, enquanto aquele dos controles positivos alogeneicos variaram de 42,75 para 70. Linhagens celulares derivadas de cordão umbilical expressaram quantidades detectáveis das proteínas estimulantes HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86, e B7-H2, quando medidas por citometria de fluxo. Linhagens celulares umbilicais não expressaram as proteínas imunomoduladoras HLA-G e CD178, porém a expressão de PD-L2 foi detectada por citometria de fluxo. PBMCs de doadores alogeneicos continham células de apresentação de antígeno expressam HLA-DP, DR, DQ, CD80, CD86,

e B7-H2, desse modo permitindo a estimulação de linfócitos alogeneicos. A ausência nas células derivadas de umbigo das moléculas de superfície de célula de apresentação de antígeno requeridas para a estimulação direta de células CD4⁺ T que não receberam tratamento, bem como a presença de PD-L2, uma proteína imunomoduladora, pode responder pelo baixo índice de estimulação por estas células em um MLR quando comparado aos controles alogeneicos.

[000299] A presente invenção não está limitada às modalidades descritas e exemplificadas acima. A invenção é capaz de variação e modificação dentro do escopo das reivindicações anexas.

EXEMPLO 15

Ensaio para Atividade de Telomerase

[000300] Telomerase funciona para sintetizar as repetições de telômero que servem para proteger a integridade dos cromossomas e prolongar o período de vida replicativo das células (Liu, K, e outro, *PNAS*, 1999; 96:5147-5152). A telomerase consiste em dois componentes, padrão de telomerase RNA (hTER) e transcriptase reversa de telomerase (hTERT). O regulamento da telomerase é determinado por transcrição de hTERT porém não de hTER. A reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR) para mRNA de hTERT é desse modo um método aceito para determinar a atividade de telomerase das células.

Isolamento de Célula

[000301] Experiências de PCR em tempo real foram realizadas para determinar a produção de telomerase das células derivadas de tecido de cordão umbilical humano. As células derivadas de tecido de cordão umbilical humano foram preparadas de acordo com os Exemplos 5-7 e os exemplos mencionados no Pedido U.S. Nº de Série 10/877.012 (o pedido '012). Geralmente, os cordões umbilicais obtidos de National

Disease Research Interchange (Philadelphia, Pa.) seguindo uma liberação normal foram lavados para remover o sangue e resíduos e mecanicamente dissociados. O tecido foi em seguida incubado com enzimas de digestão incluindo colagenase, dispase e hialuronidase em meio de cultura a 37°C. Células derivadas de tecido de cordão umbilical humano foram cultivadas de acordo com os métodos mencionados nos exemplos do pedido '012. Células-tronco mesenquimatosas e fibroblastos de pele dérmicos normais (cc-2509 lote nº 9F0844) foram obtidos de Cambrex, Walkersville, Md. Uma linhagem celular de carcinoma embrionário testicular humano pluripotentes (teratoma) células nTetra-2 (NTERA - 2 cl.DI), (vide, Plaia e outro, *Stem Cells*, 2006; 24(3):531-546) foi adquiridas de ATCC (Manassas, Va.) e foi cultivada de acordo com os métodos mencionados no pedido '012.

Isolamento de RNA Total

[000302] O RNA foi extraído das células usando kit RNeasy® (Qiagen, Valencia, Ca.). RNA foi eluído com 50 microlitros de água tratada com DEPC e armazenado a -80°C. RNA foi transcrito reverso usando hexâmeros aleatórios com os reagentes de transcrição reversa TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, Ca.) a 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 60 minutos e 95°C durante 10 minutos. As amostras foram armazenadas a -20°C.

PCR em tempo real

[000303] PCR foi realizado em amostras de cDNA usando os Applied Biosystems Assays - On-Demand® (também conhecido como Ensaio de Expressão de Gene de TaqMan®) de acordo com as especificações do fabricante (Applied Biosystems). Este kit comercial é amplamente usado para analisar quanto à telomerase em células humanas. Brevemente, hTERT (gene de telomerase humano) (Hs00162669) e GAPDH humano (um controle interno) foram misturados com mistura principal de PCR Universal TaqMan® e cDNA usando um sistema de

detecção de sequência 7000 com o software ABI prism 7000 SDS (Applied Biosystems). As condições de ciclo térmicas foram inicialmente 50°C durante 2 min e 95°C durante 10 min seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 min. Dados de PCR foram analisados de acordo com as especificações do fabricante.

[000304] Células humanas derivadas de tecido de cordão umbilical (ATCC Acesso Nº PTA-6067), fibroblastos, e células-tronco mesenquimatosas foram analisadas quanto ao RNA de 18S e hTERT. Como mostrado na Tabela 22-1, hTERT, e consequentemente telomerase, não foi detectado em células derivadas de tecido de cordão umbilical.

Tabela 22-1

	hTERT	18S RNA
Células umbilicais (022803)	ND	+
Fibroblastos	ND	+

ND- não detectado; + sinal detectado

[000305] Células derivadas de tecido do cordão umbilical humano (isolado 022803, ATCC Acesso Nº. PTA-6067) e células nTera-2 foram analisadas e os resultados não mostraram nenhuma expressão de telomerase em dois lotes de hUTC enquanto a linhagem celular de teratoma revelou nível alto de expressão (Tabela 22-1).

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de células derivadas de tecido de cordão umbilical, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença, distúrbio, ou injúria pulmonar, e o dano causado desse modo, em que as células derivadas de tecido de cordão umbilical são derivadas de tecido de cordão umbilical humano substancialmente livre de sangue, são capazes de autorrenovação e expansão em cultura, tem o potencial de diferenciar-se em células de pelo menos um tecido pulmonar e são negativas para CD117, em que a doença, distúrbio ou lesão pulmonar é enfisema, doença pulmonar obstrutiva crônica, fibrose pulmonar, lesão pulmonar aguda ou síndrome da dificuldade respiratória aguda.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a doença, distúrbio ou injúria pulmonar é, ou é causado por doenças ou distúrbios obstrutivos, doenças ou distúrbios restritivos, ou injúrias diretas ou indiretas.

3. Uso de células derivadas de tecido de cordão umbilical, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para o tratamento de doença pulmonar, em que as referidas células são derivadas de tecido de cordão umbilical humano substancialmente livre de sangue, são capazes de autorrenovação e expansão em cultura, são negativas para CD117 e CD45 e não expressam hTERT ou telomerase, em que a doença, distúrbio ou lesão pulmonar é enfisema, doença pulmonar obstrutiva crônica, fibrose pulmonar, lesão pulmonar aguda ou síndrome da dificuldade respiratória aguda.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 3, caracterizado pelo fato de que as células derivadas de tecido de cordão umbilical não expressam hTERT ou telomerase.

5. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 3, caracterizado pelo fato de que as células são induzidas *in vitro* a diferenciar-se em um

tecido pulmonar.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 3, caracterizado pelo fato de que as células exercem um efeito trófico sobre tecido pulmonar do paciente.

7. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 3, caracterizado pelo fato de que as células exercem um efeito trófico sobre o músculo liso vascular ou o endotélio vascular do paciente.

8. Uso, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o efeito trófico sobre o músculo liso vascular é a proliferação das células de músculo liso vascular.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o efeito trófico sobre o endotélio vascular é a proliferação das células endoteliais vasculares.

10. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 3, caracterizado pelo fato de que as células induzem migração de uma ou mais células endoteliais vasculares, células progenitoras de endotélio vascular, células de músculo liso vascular, células progenitoras de músculo liso vascular, ou pericitos para os sítios da doença, distúrbio ou injúria pulmonar.

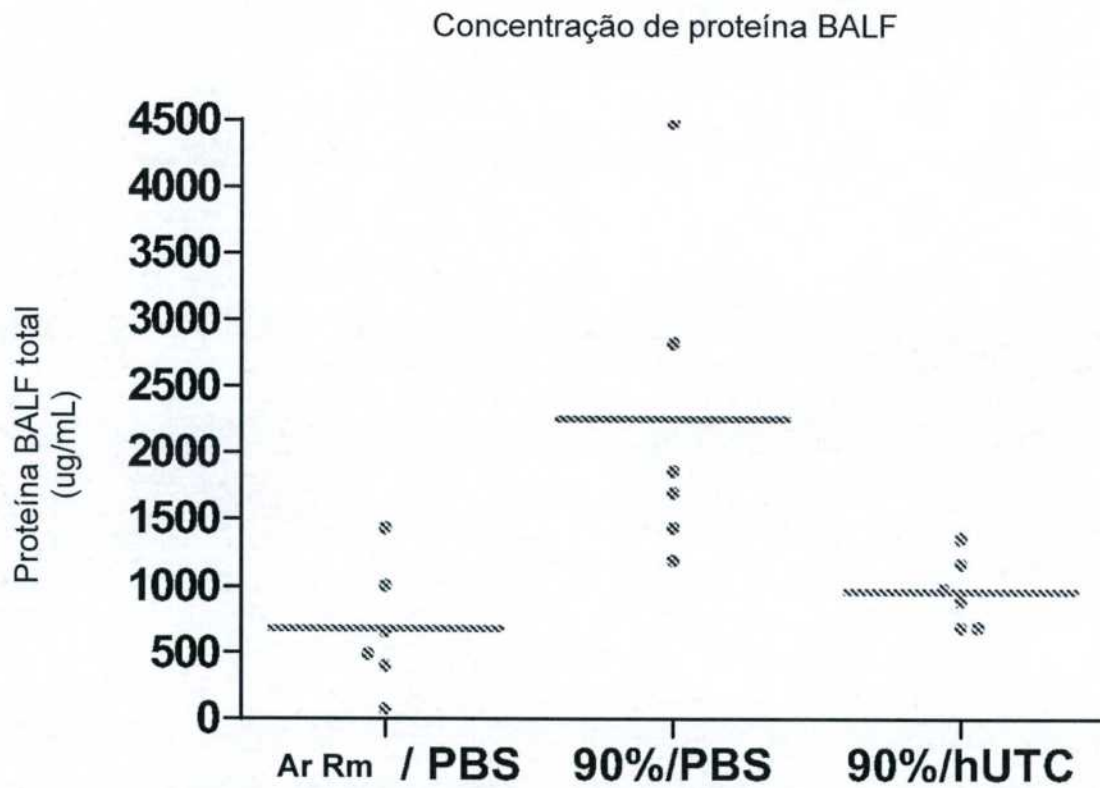
11. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 3, caracterizado pelo fato de que as células derivadas do tecido do cordão umbilical compreendem ainda uma ou mais das seguintes características:

(a) expressam CD10, CD13, CD44, CD73 e CD90;

(b) não expressam CD31 ou CD34; e

(c) expressam, em relação a um fibroblasto humano, célula-tronco mesenquimal ou célula da medula óssea da crista ilíaca, níveis aumentados de interleucina 8 e reticulon 1.

FIG. 1



Ar Rm /PBS vs. 90%/PBS, $p < 0.01$
90%/PBS vs. 90% hUTC, $p < 0.05$

FIG. 2a

Homogenado de pulmão

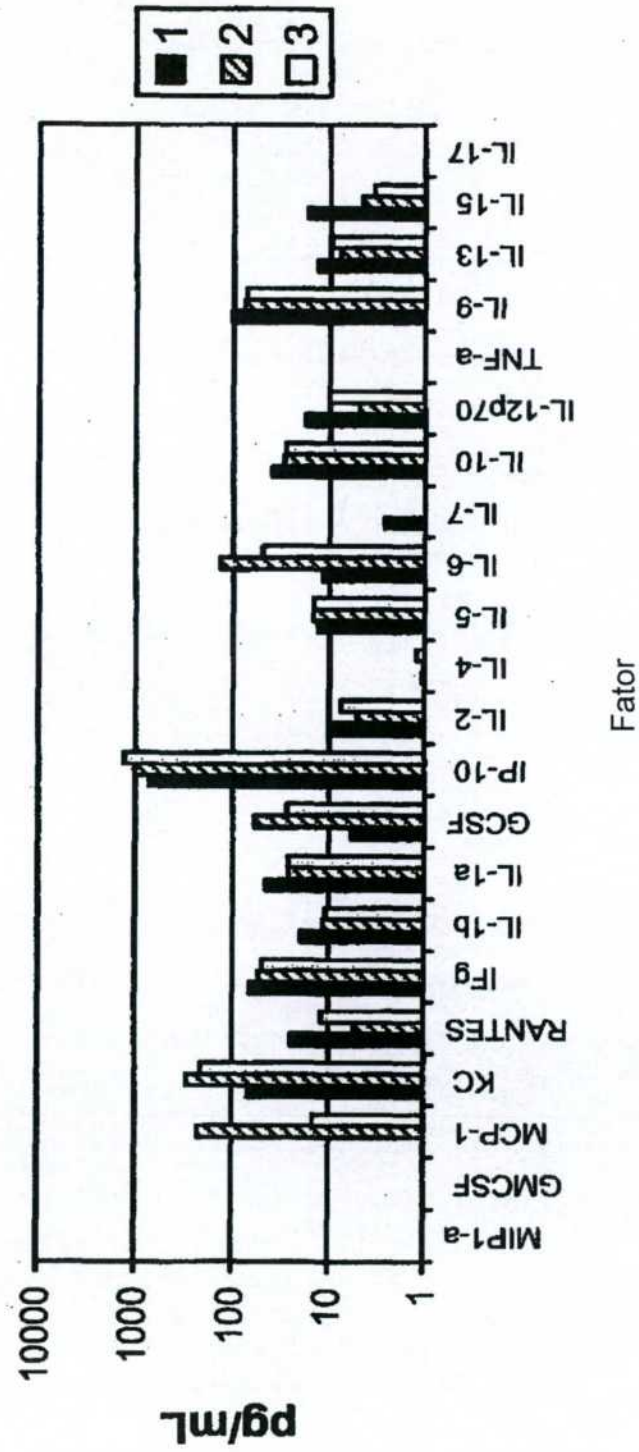


FIG. 2b

BALF

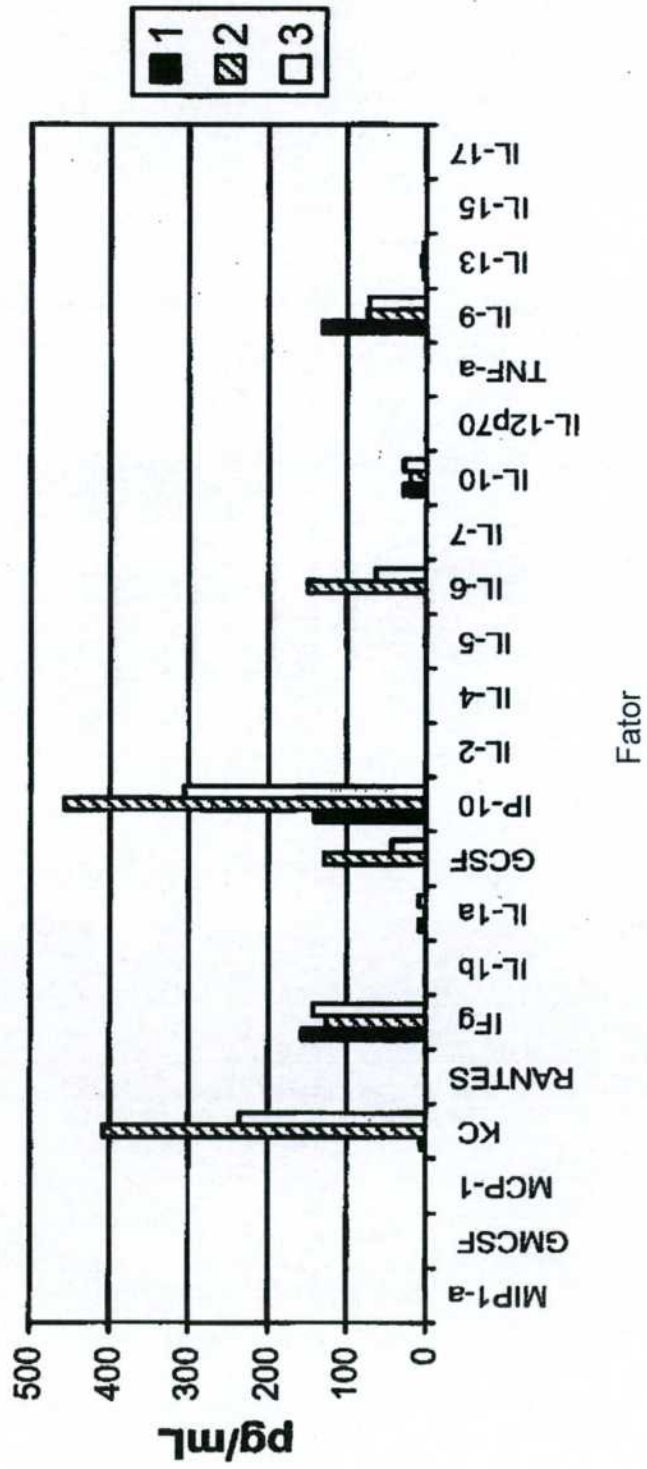


FIG. 3

Homogenizado de pulmão																								
Grupo de tratamento	Número do animal	MIPI-a	GMCSF	MCP-1	KC	RANTES	IFg	IL-1b	IL-1a	GMCSF	IP-10	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-10	IL-12p70	TNF-a	IL-9	IL-13	IL-15	IL-17	
1	1	0	0	0	53	36	52	22	0	6	840	0	1	11	1	0	27	9	0	82	8	0	0	
1	2	0	0	0	77	18	76	17	10	6	720	0	1	7	8	0	46	18	0	113	14	27	0	
1	3	0	0	0	45	24	59	14	29	4	524	9	1	12	5	0	31	15	0	82	10	0	0	
1	4	0	0	0	67	28	58	31	34	7	621	9	1	16	9	16	51	18	0	135	11	22	0	
1	5	0	0	0	101	14	83	20	0	6	824	25	1	15	34	0	42	23	0	105	22	24	4	
1	6	0	0	0	66	32	63	14	198	7	755	16	1	17	14	0	37	24	0	100	15	28	0	
Média:		0	0	0	68	25	65	20	45	6	714	10	1	13	12	3	39	18	0	103	13	17	1	
StdDev:		0	0	0	20	9	12	6	76	1	122	10	0	4	12	6	9	6	0	20	5	13	1	
2	1	0	0	0	139	149	9	70	13	37	23	1315	8	1	30	69	0	39	12	0	96	18	0	0
2	2	0	0	0	526	555	4	51	4	18	171	1146	5	1	13	448	0	20	0	0	62	7	0	0
2	3	0	0	0	111	103	9	62	24	56	8	712	7	1	14	33	0	37	4	0	82	8	0	0
2	4	0	0	0	143	322	0	34	8	9	59	503	0	1	11	91	0	26	4	0	63	6	0	0
2	5	0	0	0	143	334	7	68	11	28	20	1783	8	1	11	47	0	30	4	0	106	8	28	0
2	6	0	0	0	295	303	4	39	9	11	75	619	4	1	11	121	0	27	5	0	54	0	0	0
Média:		0	0	0	226	294	5	54	11	27	59	1013	5	1	15	135	0	30	5	0	77	8	5	0
StdDev:		0	0	0	161	160	4	15	7	18	60	492	3	0	7	156	0	7	4	0	21	6	11	0
3	1	0	0	0	115	7	50	16	30	16	1121	8	1	15	31	0	34	15	0	79	15	0	0	0
3	2	0	0	0	163	11	50	9	38	20	1105	8	1	16	36	0	28	6	0	65	9	0	0	0
3	3	0	0	0	157	13	56	7	25	24	1465	7	1	16	53	0	36	9	0	68	9	0	0	0
3	4	0	0	0	161	16	59	8	24	12	1647	7	1	14	26	0	24	5	0	90	12	21	0	0
3	5	0	0	0	337	7	41	16	26	49	711	8	1	13	64	0	25	13	0	60	6	0	0	0
3	6	0	0	0	88	318	17	40	9	15	45	1839	8	2	14	84	0	24	11	0	73	6	0	0
Média:		0	0	0	15	209	12	49	11	27	27	1315	8	1	15	49	0	29	10	0	72	10	3	0
StdDev:		0	0	0	36	94	4	8	4	8	15	413	1	0	1	22	0	5	4	0	11	4	8	0
t-teste		nd	nd	0.02	0.26	0.08	0.57	0.86	1.00	0.28	0.45	0.10	0.18	0.96	0.25	nd	0.63	0.01	nd	0.68	0.31	0.86	nd	nd

FIG. 4

Homogenizado de pulmão		Grupo de tratamento	Número do animal	MIP1-a	GMCSF	MCP-1	KC	RANTES	IFg	IL-1b	IL-1a	GCSE	IP-10	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-10	IL-12p70	TNF-a	IL-9	IL-13	IL-15	IL-17
		1	1	0	0	0	8	0	162	0	8	0	113	0	0	0	1	0	39	0	0	63	6	0	0
		1	2	0	0	0	8	0	174	0	15	0	195	0	0	0	1	0	19	0	0	170	4	0	0
		1	3	0	0	0	7	0	131	0	0	0	95	0	0	0	0	0	26	0	0	82	0	0	0
		1	4	0	0	0	8	0	195	4	9	0	176	0	0	0	1	0	35	4	0	175	5	0	0
		1	5	0	0	0	12	0	197	0	14	0	216	0	0	0	1	0	39	0	0	221	6	0	0
		1	6	0	0	0	0	0	79	0	6	0	53	0	0	0	1	0	11	0	0	82	4	0	0
	Média:			0	0	0	7	0	156	1	9	0	141	0	0	0	1	0	28	1	0	132	4	0	0
	StdDev:			0	0	0	4	0	45	2	6	0	64	0	0	0	0	0	11	1	0	65	2	0	0
		2	1	0	0	0	276	0	101	0	0	59	351	0	0	4	24	0	14	0	0	41	4	0	0
		2	2	0	0	0	425	0	127	0	0	65	381	0	0	0	36	0	24	0	0	46	5	0	0
		2	3	0	0	0	390	0	183	0	7	64	435	0	1	0	27	0	35	0	0	102	7	0	0
		2	4	0	0	0	533	0	107	0	0	284	453	0	0	4	384	0	14	0	0	49	0	0	0
		2	5	0	0	0	322	0	140	0	0	70	568	0	0	0	84	0	23	0	0	84	11	0	0
		2	6	0	0	0	501	0	104	0	0	234	554	0	0	4	347	0	13	0	0	121	7	0	0
	Média:			0	0	0	408	0	127	0	1	129	457	0	0	2	150	0	21	0	0	74	6	0	0
	StdDev:			0	0	0	100	0	31	0	3	102	89	0	0	2	169	0	9	0	0	34	4	0	0
		3	1	0	0	0	175	0	151	0	6	50	346	0	0	0	67	0	32	0	0	60	0	0	0
		3	2	0	0	0	256	0	108	0	5	45	201	0	0	0	33	0	23	0	0	41	4	0	0
		3	3	0	0	0	331	0	169	0	7	51	403	0	0	0	37	0	35	4	0	110	6	0	0
		3	4	0	0	0	222	0	134	0	12	37	246	0	0	0	61	0	24	0	0	69	4	0	0
		3	5	0	0	0	175	0	140	0	14	33	347	0	0	4	150	0	25	0	0	76	4	0	0
		3	6	0	0	0	252	0	156	0	9	44	292	0	0	0	35	0	28	0	0	77	4	0	0
	Média:			0	0	0	235	0	143	0	9	43	306	0	0	1	64	0	28	1	0	72	4	0	0
	StdDev:			0	0	0	59	0	21	0	3	7	74	0	0	2	45	0	5	2	0	23	2	0	0
	t-teste			nd	nd	nd	0.01	nd	0.26	nd	0.01	0.10	0.02	nd	0.36	0.40	0.29	nd	0.08	0.36	nd	0.88	0.27	nd	nd