



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI0620523-2 A2



(22) Data de Depósito: 29/11/2006
(43) Data da Publicação: 16/11/2011
(RPI 2132)

(51) Int.Cl.:
C12N 5/00
C12N 5/02
A61K 48/00

(54) Título: MÉTODO DE AUMENTAR O POTENCIAL DE IMPLANTE E DE ATRAÇÃO CELULAR, MÉTODO DE PREPARAR CÉLULAS PARA TRANSPLANTE EM UM SUJEITO, POPULAÇÃO DE CÉLULAS E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(30) Prioridade Unionista: 29/11/2005 US 11/289,004

(73) Titular(es): Gamida-Cell Ltd

(72) Inventor(es): Tony Peled

(74) Procurador(es): Tinoco Soares & Filho S/C Ltda.

(86) Pedido Internacional: PCT IL2006001381 de 29/11/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/063545de
07/06/2007

(57) Resumo: MÉTODO DE AUMENTAR O POTENCIAL DE IMPLANTE E DE ATRAÇÃO CELULAR, MÉTODO DE PREPARAR CÉLULAS PARA TRANSPLANTE EM UM SUJEITO, POPULAÇÃO DE CÉLULAS E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA. É previsto um método para aumentar o potencial de enxerto de célula; o método compreendendo sujeitar ex-vivo ou in-vitro uma população de células a uma quantidade de nicotinamida por um período de tempo suficiente para afetar a população de células, aumentando desse modo o potencial de enxerto da célula.

P10620523-2

Petm: 018090043404 br
(17/09/09)

"MÉTODO DE AUMENTAR O POTENCIAL DE IMPLANTE E DE ATRAÇÃO CELULAR, MÉTODO DE PREPARAR CÉLULAS PARA TRANSPLANTE EM UM SUJEITO, POPULAÇÃO DE CÉLULAS E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA"

5 CAMPO E HISTÓRICO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a métodos para aperfeiçoar a eficiência da adesão, retenção e enxerto de células transplantadas.

O transplante de medula óssea (TMO) é um procedimento clínico no qual células hematopoiéticas pluripotentes obtidas a partir da medula óssea são transplantadas para um paciente. O TMO é o tratamento de escolha em várias desordens hematológicas, incluindo malignidades, imunodeficiências combinadas graves (SCIDs), anormalidades hematopoiéticas congênitamente ou geneticamente determinadas, anemia, anemia aplástica, leucemia e osteopetrose.

Células-tronco hematopoiéticas primitivas ou pluripotentes geralmente residem na medula óssea, embora o sangue do cordão umbilical seja outra fonte funcional de células-tronco/progenitoras hematopoiéticas transplantáveis (Gluckman, E., et al 1989 N. Engl. J. Med. 321:1174). Todas essas células hematopoiéticas primitivas podem ser identificadas por seu antígeno de superfície CD34. As células-tronco hematopoiéticas se diferenciam ao longo de um dentre dois caminhos importantes - um para células-tronco linfóides ou células-tronco mieloides. Ambas se diferenciam ainda em células progenitoras para cada tipo de célula sanguínea madura. Essas células progenitoras perderam a

capacidade de auto-renovação e estão comprometidas com uma dada linhagem de células. Assim, as células-tronco linfóides se diferenciam em células progenitoras T ou B e as células-tronco mielóides se diferenciam em células-tronco progenitoras para eritrócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, mastócitos e plaquetas.

Sob condições de estado estável, a maioria das células-tronco e progenitoras hematopoiéticas reside na medula óssea e apenas algumas dessas células são detectáveis no sangue periférico. Contudo, as células-tronco podem ser mobilizadas para o sangue periférico por meio de tratamento com agentes mielossupressores e/ou certos fatores de crescimento hematopoiéticos. Estudos demonstraram que células-tronco sanguíneas periféricas (PBSC) infundidas em um hospedeiro exibiram maior potencial de enxerto quando comparadas a células-tronco e progenitoras oriundas da medula óssea. Assim, PBSC mobilizadas por quimioterapia, fatores de crescimento hematopoiético ou uma combinação dessas modalidades são atualmente usadas tanto em transplantes autólogos quanto não autólogos [Anderlini, P. e Korbling, M. (1977) Stem. Cells 15, 9-17]. No caso de transplante não autólogo, os doadores de células-tronco são indivíduos saudáveis e o procedimento para mobilização de células-tronco para a corrente sanguínea tem que ser realizado com o mínimo de desconforto. Nesse caso, prefere-se a mobilização de células-tronco com fatores de crescimento hematopoiético às drogas antiblemáticas (i.e. ciclofosfamida).

Além das células-tronco e progenitoras, podem ser utilizadas células mais diferenciadas para transplante, para tratamento de doenças ou condições de órgãos ou tecidos específicos caracterizados por disfunção celular ou morte celular. Para muitas dessas doenças as terapias médicas ou procedimentos cirúrgicos atuais são inadequados ou não existentes. A terapia celular pode substituir ou aumentar o tecido existente proporcionando uma terapia restauradora para essas condições. Exemplos de tipos de células adequadas para transplante incluem: células oriundas do tecido neural, hepatócitos, miócitos, células retinais, células endócrinas, melanócitos, ceratinócitos e condrócitos. Foi demonstrado tanto em modelos animais quanto em estudos humanos que o enxerto de células transplantadas pode restabelecer com sucesso a função tissular. Assim, podem ser implantados neurônios, por exemplo, para a Doença de Parkinson e outras doenças neurodegenerativas. Células de músculos, tais como mioblastos, podem ser transplantadas, por exemplo, para tratamento de miopatia cardíaca isquêmica. Células pancreáticas podem ser transplantadas para tratar diabetes e/ou outras doenças ou condições relacionadas com insulina e glucagon. Células sanguíneas diferenciadas, tais como linfócitos e células dendríticas também podem ser transplantadas, por exemplo, para imunoterapia por adoção com células NK.

Contudo, estudos demonstraram que a maioria das células transplantadas, tais como

hepatócitos e células neurais, é apagada do corpo depois do transplante e não se localizam nos órgãos ou tecidos alvo (De Roos et al Transplantation 1997;63:513-18; Gagandeep et AL, Gene Therapy 1999;6:729-36). Os esforços no sentido de 5 melhorar a adesão, retenção e enxerto de células transplantadas, tais como o tratamento de hepatócitos com Con A antes do implante (Ito et al, Muscle Nerve 1998;21:291-7) foram apenas ligeiramente eficientes. Portanto, os esforços foram direcionados para os métodos de 10 agrupamento e armazenagem das células recentemente preparadas (veja, por exemplo, as Patentes norte-americanas N°s. 6.713.245 e 6.821.779 para Koopmans et al), a fim de fornecer números maiores de células para transplante.

Depois do transplante, as 15 células devem migrar em direção de seus tecidos alvo. Quimioatraentes, tais como determinadas citocinas (CXCL1- CXCL16 e CCL1-CCL-27) auxiliam a direcionar as células ao seu objetivo. O fator 1 α oriundo da célula de tecido conjuntivo (SDF-1 α), também chamado de CXCL12, é um poderoso 20 quimioatraente de células CD34 $^+$, incluindo células-tronco hematopoiéticas e células-tronco neurais (Aiuti J. Exp. Med. 1997;185:111-120) e está amplamente expresso em muitos tecidos durante o desenvolvimento (McGrath Dev. Biol. 1999;213:442-456) e vida adulta (Imai BR. J. Haematol. 25 1999;106:905-911). Ele também atrai quimicamente células não tronco, tais como linfócitos T. O receptor de quimiocina 4 CXC (CXCR 4) é o receptor cognato para SDF-1 α e é expresso nas células-tronco. Estudos recentes implicaram SDF-1 α /CXCR4

como um caminho que ativa os programas moleculares e a adesão das células-tronco durante um ferimento (Jaime Imitola et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Dezembro 28; 101(52): 18117-18122).

5 A CD26/dipeptidilpeptidase IV
10 (DPPIV), uma peptidase extracelular envolvida por membrana que divide dipeptídeos, tais como SDF-1 α a partir do término N das cadeias de polipeptídeos depois de uma prolina ou uma alanina, é um antígeno sem linhagem específica, cuja expressão em células hematopoiéticas e outras células é regulada pela diferenciação e ativação. A divisão proteolítica de quimiocinas possui implicações com relação à capacidade de as células serem atraídas e/ou ativadas pelas quimiocinas (Baggiolini, M. 1998, Nature 392:565).

15 Vários estudos funcionais
aludem ao papel que CD26/DPPIV representa na migração e
mobilização de células T e células hematopoiéticas [Shioda
et al. (1998) Proc. Natl. Acad. USA 95:6331]. A inibição da
atividade endógena de CD26/DPPIV em células CD34⁺ demonstrou
20 aumentar a resposta quimiotática dessas células ao SDF-1 α
(Christopherson KW 2nd, et al., Science. 2004 Agosto
13;305(5686):1000-1003; Christopherson KW 2nd, J Immunol.
2002 Dezembro 15;169(12):7000-7008), enquanto o corte do
terminal N de SDF-1 α com DPPIV resulta em falha em induzir a
25 migração de células sanguíneas do cordão umbilical CD34⁺.

A nicotinamida (NA), a forma amida da niacina (vitamina B3), é um substrato de troca de base e um potente inibidor de enzimas dependentes de NAD(+).

dotadas de atividades mono e poli-ADP-ribosiltransferase. A ADP-ribosilação está implicada na modificação de um conjunto diverso de processos biológicos (Corda D, Di Girolamo M. 2003;22(9):1953-1958; Rankin PW, et al., J Biol Chem. 5 1989;264:4312-4317; Banasik M. et al., J Biol Chem. 1992;267:1569-1575; Ueda K, Hayaishi O, Annu Ver Biochem. 1985;54:73-100; Smith S. Trends Biochem Sci. 2001;26:174-179;virág L, Szabó C. Pharm. Reviews. 2002;54:375-429).

As ADP-ribosiltransferases endógenas responsáveis pelas reações de mono ou poli-ADP-ribosilação modificam as moléculas envolvidas na sinalização celular, tais como histonas nucleares (de La Cruz X, Lois S, et al., Bioessays. 2005;27(2):164-75), a subunidade alfa de proteínas (g) de ligação GTP, a pequena GTPase Rho, actina monomérica e fator de alongamento 2 (EF-2). Essas modificações pós-translacionais levam à ativação ou inativação de funções celulares moduladas por essas proteínas (Lupi R, et al., J Biol Chem. 2000;275:9418-9424; Lupi R, et al., Biochem J. 2002;367:1-7; Yau L, et al., Eur. 10 20 J. Biochem. 2003;270:101-110).

O Pedido de Patente norte-americana 2004/0247574 descreve o uso de inibidores de CD26 para aperfeiçoar a eficiência do enxerto de transplantes de células-tronco tanto melhorando a adesão das células-tronco 25 na medula óssea quanto aumentando o número de células-tronco do doador mobilizadas. Não descreve a diminuição do número do componente celular da expressão de superfície CD26, ao contrário, a diminuição da atividade catalítica CD26.

Especificamente, o Pedido de Patente norte-americana 2004/0247574 não descreve o uso da nicotinamida para a diminuição do número do componente celular da expressão de superfície CD26.

5 O Pedido PCT IL03/00064 revela o uso de nicotinamida e outros inibidores de CD38 para a inibição da diferenciação em células-tronco e progenitoras em expansão ex-vivo. Contudo, o PCT IL03-00064 não descreve a administração da nicotinamida para aumentar a adesão, retenção e enxerto das células, ou a administração de nicotinamida às células-tronco e progenitoras por curtos intervalos de 3 dias ou menos, administração de nicotinamida a populações de células não tronco e não progenitoras (i.e. comprometidas) 10 ou a administração de nicotinamida sem as condições para proliferação celular.

15

Portanto, é objetivo desta invenção superar as desvantagens descritas nos tratamentos atualmente disponíveis e fornecer composições e métodos para 20 o aumento do potencial de migração, retenção e adesão celular de células transplantadas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com um aspecto da presente invenção, é previsto um método para aumentar o 25 potencial de enxerto de células, o método compreendendo sujeitar, ex-vivo ou in-vitro, uma população de células a uma quantidade de nicotinamida por um período de tempo suficiente para aumentar o potencial de adesão e enxerto das

células, no qual o método é ainda caracterizado por pelo menos um dos seguintes: (i) pelo fato de que dita população de células é uma população de células-tronco e/ou progenitoras hematopoiéticas e dito período de tempo selecionado é insuficiente para a expansão de células-tronco, ou sob condições insuficientes para a expansão de células-tronco e/ou progenitoras; (ii) pelo fato de que dita quantidade de nicotinamida e dito período de tempo selecionados são suficientes para diminuir o componente celular da expressão CD26 nas células de dita população de células, mas não para a expansão das células-tronco e/ou progenitoras; (iii) dita população de células não inclui células hematopoiéticas, células-tronco hematopoiéticas, células mononucleares, células progenitoras prematuras do fígado, células progenitoras comprometidas, células-tronco e progenitoras não hematopoiéticas, ou células-tronco e progenitoras embrionárias; (iv) dita sujeição é na ausência de nutrientes; (v) dita sujeição é na ausência de citocina; (vi) dita sujeição é na ausência de ligante FLT-3; (vii) dita sujeição é na ausência do fator de célula-tronco (SCF); (viii) dita sujeição é na ausência do fator estimulante de colônia de granulócitos; (ix) dita sujeição é na ausência de uma citocina de atuação precoce; e (x) dita sujeição é na ausência de uma citocina de atuação tardia.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, é previsto um método para transplantar células em um indivíduo, o método compreendendo: (a) sujeitar ex-vivo uma população de células compreendendo as

células a uma quantidade de nicotinamida por um período de tempo suficiente para aumentar a adesão e o enxerto de ditas células; o método caracterizado ainda por pelo menos um dos seguintes: (i) pelo fato de que dita população de células é 5 uma população de células-tronco e/ou progenitoras hematopoiéticas e dito período de tempo selecionado é insuficiente para a expansão das células-tronco, ou sob condições insuficientes para a expansão de células-tronco e/ou progenitoras; (ii) pelo fato de que dita quantidade de 10 nicotinamida e dito período de tempo selecionados são suficientes para diminuir o componente celular da expressão CD26 nas células de dita população de células, mas não para a expansão das células-tronco e/ou progenitoras; (iii) dita população de células não inclui células hematopoiéticas, 15 células-tronco hematopoiéticas, células mononucleares, células progenitoras prematuras do fígado, células progenitoras comprometidas, células-tronco e progenitoras não hematopoiéticas, ou células-tronco e progenitoras embrionárias; (iv) dita sujeição é na ausência de 20 nutrientes; (v) dita sujeição é na ausência de citocina; (vi) dita sujeição é na ausência de ligante FLT-3; (vii) dita sujeição é na ausência do fator de célula-tronco (SCF); (viii) dita sujeição é na ausência do fator estimulante de colônia de granulócitos; (ix) dita 25 sujeição é na ausência de uma citocina de atuação precoce; (x) dita sujeição é na ausência de uma citocina de atuação tardia; e (b) transplantar as células em um indivíduo que as necessite.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, o indivíduo é um ser humano.

5 De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, a nicotinamida é selecionada do grupo que consiste de nicotinamida, um análogo de nicotinamida, um metabólito de nicotinamida, um metabólito análogo de nicotinamida e derivados da mesma.

10 De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, a população de células é oriunda de um órgão selecionado do grupo que consiste de um músculo, pele, um osso, um órgão linfático, pâncreas, fígado, vesícula biliar, 15 rim, órgão do trato digestivo, órgão do trato respiratório, órgão reprodutivo, órgão do trato urinário, órgão associado ao sangue, timo, baço, órgão do sistema nervoso.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos 20 descritos, a população de células não inclui células hematopoiéticas, células-tronco hematopoiéticas, células mononucleares, células progenitoras prematuras do fígado, células progenitoras comprometidas, células-tronco e progenitoras não hematopoiéticas, ou células-tronco e 25 progenitoras embrionárias.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, a população de células compreende células-tronco.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, a população de células é oriunda de uma fonte selecionada do grupo que consiste de células hematopoiéticas, células sanguíneas do cordão umbilical, células sanguíneas periféricas mobilizadas, células da medula óssea.

5 De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, a população de células é oriunda da medula óssea ou sangue periférico.

10 De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, a população de células é oriunda do sangue do cordão umbilical neonatal.

15 De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, a população de células é oriunda de uma fração de células mononucleares.

20 De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, as células-tronco são enriquecidas para células-tronco hematopoiéticas.

25 De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, os métodos para aumentar o potencial de enxerto e transplante de células-tronco, compreendendo ainda a etapa de selecionar uma população de células enriquecidas para

células-tronco hematopoiéticas antes de, simultaneamente com ou em seguida a dita etapa de sujeição ex-vivo.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, a seleção é efetuada via CD34.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, os métodos para aumentar o potencial de enxerto e transplante de células-tronco, compreendendo ainda a etapa de selecionar uma população de células enriquecidas para células-tronco hematopoiéticas prematuras antes de, simultaneamente com ou em seguida a dita etapa de sujeição ex-vivo.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, a seleção é efetuada via CD133.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, a seleção é efetuada via CD34/CD38.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, o período de tempo é entre 1 e 18 semanas.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, o período de tempo é entre 1 e 7 dias.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, o período de tempo é entre 2 e 4 dias.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, o período de tempo é entre 12-30 horas.

5 De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, o período de tempo não excede 72 horas.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, dita população de células é uma população de 10 células-tronco e progenitoras hematopoiéticas e dito período de tempo selecionado é insuficiente para expansão da célula-troco.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos 15 descritos, dita população de células é uma população de células-tronco e progenitoras hematopoiéticas e dito sujeição é realizada sob condições insuficientes para expansão da célula-troco.

De acordo ainda com outras 20 características dos modos de realização preferidos descritos, ditas condições insuficientes para expansão de célula-tronco são selecionadas a partir do grupo que consiste de ausência de nutrientes, ausência de citocinas de atuação tardia e ausência de 25 citocinas de atuação precoce.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, dito período de tempo é suficiente para diminuir

o componente celular da expressão CD26 nas células, mas insuficiente para a proliferação de células.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, uma concentração de dita nicotinamida é de 0,01-60 mg/ml.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, a quantidade eficiente de nicotinamida é de 1,0-40 mg/kg de peso corporal.

De acordo ainda com outras características dos modos de realização preferidos descritos, a quantidade eficiente de nicotinamida é de 10-20 mg/kg de peso corporal.

De acordo ainda com outro aspecto da presente invenção, é prevista uma população de célula compreendendo as células caracterizadas por adesão e/ou enxerto melhorado de acordo com os métodos acima.

De acordo com um aspecto adicional da presente invenção é prevista uma composição farmacêutica compreendendo como ingrediente ativo a população de célula e um transportador farmaceuticamente aceitável.

De acordo ainda com um aspecto adicional da presente invenção é previsto o uso de nicotinamida para a fabricação de um medicamento identificado para aperfeiçoar o enxerto e/ou adesão de células-tronco.

A presente invenção aborda as desvantagens das configurações atualmente conhecidas fornecendo métodos para aumentar a mobilização e migração de células-tronco, tanto antes quanto depois do transplante de 5 células-tronco.

A menos que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos utilizados aqui possuem o mesmo significado comumente entendido por aquele geralmente familiarizado com o assunto ao qual pertence esta 10 invenção. Embora métodos e materiais semelhantes ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser utilizados na prática ou em testes da presente invenção, métodos e materiais adequados são descritos abaixo. Em caso de conflito, prevalece o relatório da patente, inclusive 15 definições. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são ilustrativos apenas e não se destinam a ser limitantes.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A invenção é aqui descrita, a título de exemplo apenas, com referência aos desenhos 20 anexos. Com referência específica agora aos desenhos em detalhe, destaca-se que os particulares são ilustrados a título de exemplo e com a finalidade de discussão ilustrativa dos modos de realização preferidos da presente invenção apenas e são apresentados de modo a fornecer o que 25 se acredita ser a descrição mais útil e mais prontamente compreensível dos princípios e aspectos conceituais da invenção. A esse respeito, não é feita uma tentativa de mostrar detalhes estruturais da invenção em mais detalhes do

que o necessário para uma compreensão fundamental da invenção, a descrição tomada em conjunto com os desenhos tornado evidente para aqueles familiarizados com o assunto a maneira pela qual as várias formas da invenção podem ser 5 concretizadas na prática.

Nos desenhos:

as figuras 1a-1i são uma representação gráfica da análise citométrica de fluxo do efeito da nicotinamida sobre a adesão das células-tronco hematopoiéticas na medula óssea de camundongos NOD/SCID. Células mononucleares não submetidas à cultura ou sua progênie inteira depois de expansão de 3 semanas com citocinas e nicotinamida (citocinas+NA) ou citocinas isoladamente (citocinas) foram rotuladas com CFSE e infundidas em camundongos NOD/SCID irradiados subletalmente (10×10^6 células/camundongo para o grupo não submetido à cultura contendo 5×10^4 células CD34+ e a progênie total de 5×10^4 células CD34+ depois de expansão de 3 semanas com ou sem nicotinamida; 20×10^6 células/camundongo contendo 180×10^4 células CD34+). A figura 1a é um histograma dos resultados da citometria de fluxo de células da medula óssea do receptor demonstrando adesão de células CFSE+/CD34+ depois do transplante. A figura 1b é um histograma dos resultados da citometria de fluxo de células da medula óssea

do receptor mostrando adesão das células totais CFSE+ depois do transplante. A adesão de células humanas é apresentada como número de eventos positivos (citometria) por 100.000 células de BM analisadas. Cada barra representa a média ± SE de 3 experimentos independentes (6-7 camundongos/grupo experimental). Na análise representativa da citometria de fluxo de células da medula óssea de camundongos não injetados (figura 1 c) e camundongos injetados com células não submetidas à cultura (figuras 1d e 1g), são mostradas as células de cultura com citocinas (figura 1e 1h) e as células de cultura com citocinas e nicotinamida (figuras 1f e 1i). As células humanas totais que aderem à BM são confinadas (veja a área R2) com base na baixa dispersão lateral (eixo y) e distribuição de fluorescência de registro da expressão CFSC (figuras 1c-1f). A fluorescência brilhante de CFSE foi suficiente para separar as células humanas rotuladas das células de murina não rotuladas pelo menos 1 log. Células confinadas em R2 foram então analisadas para CFSE (eixo x) e CD34-APC (eixo y) (figuras 1g-1i). Os quadrantes superior e inferior direito representam o total de células humanas enquanto o quadrante superior direito representa as células CD34+ humanas que aderem à BM;

a figura 2 é um histograma que mostra o efeito da nicotinamida sobre a migração in-vitro das células hematopoiéticas. A migração de transwell induzida por CXCL12 (100ng/ml) das células CD34+ purificadas antes (não submetidas à cultura) ou depois 3 de semanas de cultura com citocinas e nicotinamida (citocinas+NA) ou citocinas isoladamente (citocinas) (n=3. *p<0,02, **p<0,05) foi medida conforme descrito aqui abaixo. Observe a maior migração de células de cultura na presença de nicotinamida;

a figura 3 é um gráfico que ilustra o efeito da nicotinamida sobre a ligação mediada por VLA4 de células para adesão imobilizada de moléculas sob fluxo de cisalhamento. As células CD34+ de cultura conforme descrito nas figuras 1 e 2 acima foram testadas para capturar e reter sob tensão de cisalhamento, em VCAM-1 imobilizado adsorvido como 10 µl de pontos em poliestireno.

Os eventos de colonização e retenção de células foram analisados sob perfusão (tensão de cisalhamento) por vídeo fotografia. As populações de células submetidas ao ensaio eram células antes da cultura (não submetidas à cultura, círculos abertos), células de cultura com citocinas, conforme descrito na figura 2 (de cultura, círculos fechados) e células de cultura com citocinas e nicotinamida (cultura+NA,

triângulos fechados). Observe o efeito significativo e consistente da nicotinamida sobre a adesão de ligação mediada por molécula; as figuras 4a-4f são uma representação gráfica do efeito da nicotinamida sobre a adesão e enxerto de células hematopoiéticas humanas transplantadas para camundongos NOD/SCID. As figuras 4a e 4b mostram a porcentagem de células humanas (CD45+) nas populações de células antes do transplante; células CD34+ não submetidas à cultura (não submetidas à cultura, ovais cinzas), a progênie inteira de culturas depois de 3 semanas de exposição à citocinas isoladamente (citocinas isoladamente, ovais fechadas), ou citocinas e 10 nicotinamida (citocinas+NA, setas). O percentual de enxerto 4 semanas após o transplante foi determinado por citometria de fluxo de células CD45 humanas na medula NOD/SCID (eixo y). Os 15 números de células de repopulação SCID (SRC) foram calculados ilustrando as freqüências de enxerto a cada dose. As curvas resultantes indicam a freqüência estimada de SRCs dentro das 20 células CD34+ não submetidas à cultura (Figura 4c), cultura com citocinas (figura 4d) ou citocinas e nicotinamida (figura 4e). O número 25 mostrado em cada quadro indica a freqüência calculada de SRCs usando o avaliador de probabilidade máxima. A figura 4f ilustra o

imunofenótipo de células humanas enxertadas em camundongos representativos transplantados com a progénie de 12×10^3 células CD34+ de cultura durante 3 semanas com nicotinamida, conforme determinado por FACS. As células da medula óssea de camundongo foram duplamente coradas com anti-CD45 (humano) FITC-conjugado e anticorpos para marcadores de diferenciação humanos conforme indicado. As porcentagens de células positivas duplas são ilustradas dentro de cada quadrante.

Observe o aumento do enxerto 7 vezes maior nos camundongos tratados com nicotinamida (figura 4e), comparados aos camundongos tratados com citocinas isoladamente (figura 4d); e

as figuras 5a-5c são uma representação gráfica do efeito da nicotinamida (NA) sobre o potencial de enxerto das células de cultura sob condições de promoção de diferenciação. Foram iniciadas culturas com células CD34+ derivadas de sangue do cordão umbilical purificado em meio suplementado com SCF, TPO, IL-6 e FLT3, 50 ng/ml cada e IL-3, 20 ng/ml, com (citocinas+NA, setas) ou sem (citocinas, ovais) 10 mM de nicotinamida. Depois de 3 semanas, as células foram colhidas e transplantadas para camundongos SCID, conforme indicado. Os camundongos foram transplantados com $1,25 - 5 \times 10^4$ células CD34+ ou sua progénie depois da expansão. Os camundongos foram

sacrificados 4 semanas depois e as células da medula óssea terem sido analisadas por FACS quanto à presença de células CD34+ (progenitoras humanas) e CD45+ (humanas). Os camundongos foram classificados como enxertados quando o número de células humanas (CD45+) constituiu $\geq 0,5\%$ da população na medula. A figura 4a mostra os números de camundongos enxertados positivamente pelo número total de camundongos transplantados para cada uma das doses de células transplantadas (células $5,0 \times 10^4$; $2,5 \times 10^4$; e $1,25 \times 10^4$). As figuras 4b e 4c demonstram a porcentagem de células humanas totais (CD45+) (figura 4b) e células progenitoras humanas transplantadas (CD45+CD34+) (figura 4c) na medula óssea de camundongos com células oriundas da cultura iniciada com $1,25 \times 10^4$ células CD34+. Note o enxerto melhor tanto de células totais humanas quanto progenitoras resultante do tratamento com nicotinamida.

As células preparadas para transplante podem ser mantidas em uma solução fisiológica, ou cultivadas em suspensão ou em um substrato fixo. Os meios de cultura adequados capazes de sustentar as células incluem HEM, DMEM, RPMI, F- 12, e similares. Se necessário, o meio pode conter suplementos necessários para o metabolismo celular como a glutamina e outros aminoácidos, vitaminas,

minerais e proteínas úteis como transferrina, e similares. O meio pode também conter antibióticos para prevenir a contaminação com levedura, bactéria e fungo, como penicilina, estreptomicina, gentamicina, e similares. Se as 5 células forem ser cultivadas, as condições deverão ficar próximas às condições fisiológicas (preferencialmente, um pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, e uma temperatura de aproximadamente 30° C a aproximadamente 40° C). O meio de cultura pode ser opcionalmente suplementado com pelo menos 10 um fator de crescimento de indução de proliferação, como EGF, anfiregulina, fator de crescimento de fibroblasto acetoso (aFGF ou FGF-I), fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF ou FGF -2), fator de crescimento transformador alfa (TGF-alpha), citocinas como G-CSF, GM-CSF, SCF, ligante 15 FLT-3, e/ou quemocinas como IL-8, MIP- 1 α , Gro β , e SDF-I, e combinações destas. Ainda, para o fator de crescimento de indução de proliferação, outros fatores de crescimentos podem ser acrescentados ao meio de cultura, incluindo NGF, o fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF), hormônio 20 liberador da tirotropina (TRH), e similares.

A seleção e enriquecimento das células específicas podem ser realizados, como a separação dos hepatócitos a partir do tecido de fígado, separação de neurônios das células gliais, ou isolamento das células 25 ilhotas do tecido pancreático, por meio morfológico, físico, imunohistoquímico (FACS) ou outros meios. Os preparos de células frescas ou cultivadas podem ser crio-preservados até que sejam necessários para qualquer método conhecido na

técnica. As células podem ser suspensas em uma solução isotônica, preferencialmente, um meio de cultura celular, contendo um criopreservante específico. Estes criopreservantes incluem Dimetil Sulfóxido (DMSO), glicerol, 5 e similares. Outros métodos para preparo e armazenamento de células para transplante são conhecidos na técnica e revelados em detalhes no, por exemplo, Manual Handbook of Transplantation (Manual de Transplante) (Kipshidze e Serruys, eds. Londres, UK, 2004).

10 Os métodos de preparo das células-tronco são bem conhecidos na técnica, comumente selecionando as células expressando um ou mais marcadores de célula-tronco como CD34+, CD133, etc, ou a falta de marcadores de células diferenciadas. A seleção é normalmente 15 por FACS, ou separação imunomagnética, mas também poderá ser por métodos de ácido nucléico como PCR (ver Materiais e Métodos Experimentais abaixo). As células-tronco embrionárias e os métodos de recuperação são bem conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, em Trounson AO 20 (Reprod Fertil Dev (2001) 13: 523), Roach ML (Methods Mol Biol (2002) 185: 1), e Smith AG (Annu Rev Cell Dev Biol (2001) 17:435). As células-tronco adultas são células-tronco, que são derivadas dos tecidos de adultos e são também bem conhecidas na técnica. Métodos de isolamento ou 25 enriquecimento para células-tronco adultas são descritas, por exemplo, Miraglia, S. et al. (1997) Blood 90: 5013, Uchida, N. et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 14720, Simmons, PJ. et al. (1991) Blood 78: 55, Prockop DJ

(Cytotherapy (2001) 3: 393), Bohmer RM (Fetal Diagn Ther (2002) 17: 83) e Rowley SD et al. (Bone Marrow Transplant (1998) 21: 1253), Stem Cell Biology Daniel R. Marshak (Editor) Richard L. Gardner (Editor), Editora: Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001) e Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Anthony D. Ho (Editor) Richard Champlin (Editor), Editora: Marcel Dekker (2000).

Será apreciado que a nicotinamida pode intensificar o enxerto e a hospedagem em potencial em uma ampla variedade de tipos de células. Por exemplo, a nicotinamida pode reduzir a taxa da expressão da superfície de CD26, e intensificar a funcionalidade de VLA-4, CXCR-2 ou outras moléculas de adesão de qualquer tipo celular expressando o mesmo e já que estas moléculas são amplamente expressas em populações celulares de origem diversa, a população das células deste aspecto da presente invenção pode compreender populações celulares não selecionadas, como preparos de células cruas do tecido, ou células-tronco mononucleares e/ou progenitoras, assim como as populações mais homogêneas de tipos celulares selecionados.

Como aqui usado, a expressão "células mononucleares hematopoiéticas" refere-se a todo o repertório dos glóbulos brancos presente em uma amostra de sangue, normalmente células mononucleares hematopoiéticas que compreendem uma maior fração de células hematopoiéticas comprometidas e uma menor fração de células-tronco hematopoiéticas e progenitoras. Em um ser humano saudável,

os glóbulos brancos compreendem uma mistura de linhagem hematopoiética comprometida e células diferenciadas (tipicamente sobre 99 % nas células mononucleares são células comprometidas de linhagens) incluindo, por exemplo:

5 células progenitoras comprometidas de linhagem CD34+CD33+ (células comprometidas mielóide), CD34+CD3+ (células comprometidas linfóide) CD34+CD41+ (células comprometidas megacariocíticas) e células diferenciadas - CD34+" CD33+ (mieloides, como granulócitos e monócitos), CD34+"CD3+,

10 CD34+"CD19+ (células T e B, respectivamente), CD34+"CD41+ (megacariócitos), e células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras precoces como CD34+linhagem negativa (Lin-), CD34+-Linhagem negativa CD34+CD38" (tipicamente menor do que 1 %).

15 As células mononucleares hematopoiéticas são tipicamente obtidas de uma amostra de sangue pela aplicação da amostra de sangue na camada Ficoll-Hypaque e coletando, após a centrifugação por gradiente de densidade, uma camada de interface presente entre a Ficoll-Hypaque e o soro do sangue, cuja camada de interface essencialmente e totalmente consistem nos glóbulos brancos presentes na amostra de sangue.

Atualmente, as células-tronco hematopoiéticas podem ser obtidas por maior enriquecimento das células mononucleares hematopoiéticas obtidas por centrifugação de densidade diferencial como acima descrito. Assim, o processo de enriquecimento é tipicamente realizado pela separação imunológica como a separação imunomagnética.

ou FACS e resulta em uma fração celular que seja enriquecida para células-tronco hematopoiéticas (para descrição detalhada de enriquecimento de células-tronco hématopoiéticas, ver Materiais e Métodos Experimentais na 5 seção de Exemplos abaixo).

Independente da origem das células empregadas e sua composição, uma vez que a células sejam obtidas, elas estão sujeitas a (em contato com) uma quantia de nicotinamida por um período de tempo suficiente 10 para intensificar o enxerto e a hospedagem das células após o transplante. Este período de tempo pode ser breve, ou mais longo, conforme necessário. Em uma configuração preferida, o contato é por um período de tempo suficiente para reduzir a expressão da superfície da CD26. Em outra configuração 15 preferida, as células são células-tronco hematopoiéticas, e o contato é por um período de tempo insuficiente para a proliferação das células-tronco (também referida como expansão) enquanto que suficiente para redução da expressão da superfície da CD26. Ainda em outra configuração, o 20 contato é por um período de tempo suficiente para aumentar a funcionalidade da VLA-4, CXCR2 e outras adesões e/ou moléculas integrin.

Os métodos para determinar a expressão da superfície celular da proteína são bem 25 conhecidos na técnica. Exemplos incluem métodos imunológicos, como, análise FACS (ver seção de Exemplos) assim como métodos bioquímicos (classificação da superfície da célula, como por exemplo, radioativo, fluorescência,

avidina-biotina).

Os métodos de análise da proliferação celular são bem conhecidos na técnica (como MTT, incorporação de timidina, FACS). Será apreciado que a 5 taxa de duplicação da célula possa ser derivada da literatura.

Dependendo no tipo da célula e o uso pretendido desta, as células podem ser sujeitadas ex-vivo para nicotinamida por um contato de longo período, como 10 por exemplo, períodos de semanas ou mais, e as células podem até mesmo serem armazenadas e contato com a nicotinamida antes do uso para transplante. Ainda, de acordo com determinadas configurações, é desejável que a exposição seja por curto período. O contato por longo período pode ser 15 entre 1 e 18 semanas, preferencialmente entre 3 e 9 semanas, mais preferencialmente entre 2 e 5 semanas, ainda mais preferencialmente entre 2 e 3 semanas. O contato por curto período pode ser por 1 a 2 semanas, preferencialmente uma semana ou menos, mais preferencialmente entre 1-5 dias.

20 Enquanto reduz a presente invenção à prática, foi revelado que 20 horas de exposição das células-tronco hematopoiéticas à nicotinamida foi suficiente para realizar a redução na expressão da CD26, crucial para a hospedagem e enxerto da célula, apesar de 25 insuficiente para permitir que a expansão ou proliferação da célula-tronco ocorra. Assim, de acordo com uma configuração da presente invenção, as células ficam sujeitas ex-vivo à nicotinamida por um período de tempo não excedendo poucos

dias, preferencialmente 30 horas, mais preferencialmente 1-30 horas, ainda mais preferencialmente 5-30 horas, ainda mais preferencialmente 10-30 horas. Em outra configuração preferida, as células são células tronco e/ou células progenitoras e a duração da exposição à nicotinamida é selecionada de forma insuficiente para a expansão da célula-tronco, ou sob condições insuficientes para a expansão da célula-tronco, esta ausência de citocinas, ausência de nutrientes, temperatura subótima, etc.

10 A nicotinamida é preferencialmente apresentada e, uma concentração final de 0.01-60 mg/ml, preferencialmente 1-40 mg/ml, mais preferencialmente 5-30 mg/ml, e ainda mais preferencialmente 10-20 mg/ml. A seleção do meio de cultura e suplementos de 15 meio, depende das células e seu uso pretendido.

Em uma configuração preferida as células sujeitadas à nicotinamida podem ser usadas para transplante em um sujeito com necessidade destas, após a exposição à nicotinamida por um período de tempo pré-determinado, sem mais expansão ex-vivo. Será apreciado que a exposição à nicotinamida pode ser realizada nas células que possuem tratamento ex-vivo adicional, como expansão, seleção, modificação genética, etc. bem conhecidos na arte, incluindo exposição ex-vivo anterior à nicotinamida e, 25 preferencialmente, antecedendo o uso destes para o enxerto.

Após a exposição à nicotinamida, as células podem, então, serem transplantadas (administradas) ao sujeito com necessidades destas. A seguir

um resumo de algumas aplicações clínicas que podem ser direcionadas de acordo com as instruções da presente invenção.

Transplante de célula
hematopoiética: o transplante de células hematopoiéticas tornou-se o tratamento de escolha para uma variedade de doenças hereditárias ou malignas. Enquanto os procedimentos de transplante precoce utilizaram toda a população da medula óssea (BM), recentemente, foram usadas populações mais definidas, enriquecidas para células-tronco (CD34⁺ células) [Van Epps Blood Cells 20:411, (1994)]. Além da medula, estas células poderiam ser derivadas de outras fontes como sangue periférico (PB) e sangue do cordão umbilical neonatal (CB) [Emerson Blood 87:3082 (1996)]. Comparado à BM, transplante com as células PB encurta o período de pancitopenia e reduz os riscos de infecção e sangramento [Brugger N Engl J Med 333:283, 1995; Williams Blood 87:1687, (1996); Zimmerman J Hematology 5:247, (1996)].

Uma vantagem adicional do uso de PB para transplante é sua acessibilidade. O fator limitante para transplante de PB é o baixo número de células-tronco/progenitoras pluripotentes em circulação.

Para se obter suficientes células-tronco derivadas de PB para transplante, estas células são "colhidas" por leucoforese repetido após sua mobilização a partir da medula na circulação por tratamento com quimioterapia e citocinas [Brugger N Engl J Med 333:283,

1995; Williams Blood 87:1687, (1996)]. Este tratamento não é obviamente adequado para doadores normais.

O uso de células-tronco expandidas ex-vivo para transplante possui as seguintes vantagens [koller Blood 82:378, (1993); Lebkowski Blood Cells 20:404, (1994)]:

10 Reduz o volume de sangue necessário para reconstituição de um sistema de hematopoiéticas adultas e pode remover a necessidade para mobilização e leucoforese [Brugger N Engl J Med 333:283, 1995].

Possibilita a armazenagem de pequenos números de células-tronco PB ou CB para futuro uso potencial.

15 No caso do transplante autólogo de recipientes com malignâncias, as células contaminantes de tumor células em infusão autológica com freqüência contribuem com a recorrência da doença [Brugger N Engl J Med 333:283, 1995]. Selecionar e expandir as células-tronco CD34+ reduzirá a carga de células de tumor no transplante final.

20 As culturas apresentam uma depleção significante de linfócitos T, que podem ser úteis no transplante alogeneico determinadas para reduzir a doença de redução de enxerto- versus-hospedagem.

25 Estudos clínicos indicam que o transplante de células expandidas ex-vivo células derivadas de um número pequeno de células PB CD34+ pode restaurar a

hematopoiese em recipientes tratados com altas doses de quimioterapia, apesar dos resultados não ainda permitirem sólidas conclusões sobre as capacidades hematopoiéticas *in-vivo* por longos períodos destas células cultivadas [Brugger
5 N Engl J Med 333:283, 1995; Williams Blood 87:1687, (1996)].

Para um transplante bem sucedido, a redução da duração da fase citopênica, assim como enxerto de longo período, é crucial. Inclusão de intermediário e as últimas células progenitoras no 10 transplante poderiam acelerar a produção das células maduras derivadas do doador, assim reduzindo a fase citopênica. É importante, portanto, que células expandidas ex-vivo incluam, além das células-tronco e/ou progenitoras sujeitadas à nicotinamida como acima descrito, mais células 15 diferenciadas a fim de otimizar a recuperação de curto-período e restauração de longo-período da hematopoiese. A inclusão de células intermediárias expandidas e comprometidas em retardo, especialmente aquelas comprometidas às linhagens neutrofílicas e megacariocíticas, 20 concomitante com as células-tronco e/ou progenitoras expandidas, deveriam servir para este propósito [Sandstrom Blood 86:958, (1995)].

Estas culturas podem ser úteis na restauração da hematopoiese em recipientes com medula óssea completamente removida, assim como no fornecimento de uma medida de suporte para reduzir a recuperação da medula óssea do recipiente após as radio- ou quimioterapias convencionais.

Regeneração do tecido: As populações de célula-tronco da presente invenção podem ser a promoção da regeneração do tecido. O transplante de células-tronco é uma grande promessa em benefícios na medicina regenerativa, cirurgia reconstrutiva, engenharia do tecido, regeneração de novos tecidos e, naturalmente, cura de órgãos doentes ou feridos (para análise ver Czyz et al, Biol Chem, 2003;384:1391-40, Sylvester et al Arch Surg 2004; 139:93-99). Ainda, as células dos neurônios e gliais foram usadas para transplante no tratamento da doença de Huntington (Patente EUA No. 6,524, 865 para Freed et al) e as células ilhotas pancreáticas células estão sendo usadas para transplante para diabetes do tipo I e tipo II (ver, por exemplo, Patentes EUA 6,326,201, para Fung et al; e 7,045,349 para Benedict et al). Músculos e células derivadas dos músculos estão sendo investigadas para uso clínico apresentaram resultados promissores quando transplantados em tecido coronário danificado, tecido ósseo e estruturas articulares (ver Patente EUA No. 6,866,842 para Chancellor, et al). Assim, de acordo com um aspecto da presente invenção, as células para enxerto ou transplante podem ser derivadas de um órgão selecionado a partir do grupo consistindo de um músculo, pele, um osso, um órgão linfático, um pâncreas, um fígado, uma vesícula biliar, um rim, um órgão do trato digestivo, um órgão do trato respiratório, um órgão reprodutor, um órgão do trato urinário, um órgão associado ao sangue, um timo, um baço e um órgão do sistema nervoso. Exemplos de células que podem

ser preparadas para implante por métodos da presente invenção incluem culturas primárias assim como linhas celulares estabelecidas. Exemplos destas incluem, mas sem limitações, células das ilhotas pancreáticas, fibroplasto do prepúcio humano, insulomas de células betas, células NT2, células embriônicas, células-tronco embriônicas, hepatócitos, células mesencefálicas ventrais de secreção de dopamina, células neuroblastóides, células da medula adrenal, combinações de células T destas, e similares. Como pode ser observado a partir desta lista, células de todos os tipos, incluindo cutâneas, neural, sangue, órgãos, músculo, glandular, óssea, digestiva, reprodutiva e células do sistema imunológico, assim como as células de todas as espécies de origem, podem ser preparadas com sucesso através deste método.

DESCRIÇÃO DAS CONFIGURAÇÕES PREFERIDAS

A presente é uma invenção de métodos de melhora da capacidade de colonização de células transplantadas.

Os princípios e a operação da presente invenção podem ser melhor compreendidos com referência às descrições que acompanham.

Antes de explicar pelo menos uma configuração da invenção em detalhes, deve-se entender que a invenção não se limita em seu pedido aos detalhes estabelecidos na seguinte descrição ou exemplificados em Exemplos. A invenção é capaz de outras configurações ou de ser praticada ou realizada de diversas formas.

Adicionalmente, deve-se entender que a fraseologia e terminologia aqui empregadas objetiva a descrição e não deve ser considerada limitada.

Transplantes de sangue e
medula de sucesso, tanto autólogos quanto alogênicos,
requerem a infusão de um número suficiente de células-tronco
hematopoiéticas capazes de migrar para a cavidade da medula
e regenerar um conjunto inteiro de linhagens de células
hematopoiéticas no devido momento. O recrutamento de
células-tronco a partir da medula para o sangue é designado
mobilização, ou, mais comumente mobilização de célula-
tronco. É bem-estabelecido que o aprimoramento da
mobilização de célula-tronco e/ou migração para o local de
reparo resulta em sucesso de transplante de célula-
tronco.

SDF- α ataca quimicamente
tronco hematopoiético e células progenitoras (HSCs/HPCs) e
pode ter papel fundamental na mobilização de HSCs/HPCs ad
medula óssea, assim como na migração de célula-tronco para o
local de reparo.

CD26 é uma glicoproteína de
superfície celular 110 kDa amplamente distribuída com
conhecida atividade dipeptidil peptidase IV (DPPIV) em seu
domínio extracelular capaz de quebrar peptídeos N-terminal a
partir de polipeptídeos com resíduos de prolina e alanina na
penúltima posição. CD26 inibe a atividade SDF ao quebrá-lo
na prolina posição 2, inibindo, assim, suas funções de
mobilização/migração de célula-tronco.

O Pedido de Patente EUA

2004/0247574 ensina a usar os inibidores de CD26 para melhorar a eficiência da pega de transplantes de célula-tronco melhorando tanto a migração da célula-tronco para a medula óssea quanto aumentando o número de células-tronco do doador mobilizadas. Não ensina regulação descendente da expressão da superfície de CD26, mas sim a regulação descendente da atividade catalítica de CD26. Especificamente, o Pedido de Patente EUA 2004/0247574 não ensina o uso de nicotinamida para a regulação descendente de expressão da superfície de CD26.

Ao reduzir a presente invenção à prática, o presente inventor descobriu que a nicotinamida pode ser usada com êxito para regular de maneira descendente a expressão da superfície celular de CD26, aprimorar a expressão e função das moléculas de adesão e integrinas, aumentar a migração celular transplantável induzida e melhorar significativamente a capacidade de colonização de células transplantáveis in-vivo.

Conforme demonstrado adiante e na seção Exemplos a seguir, o presente inventor mostrou que a incubação de curto-prazo de células com nicotinamida é suficiente para a regulação descendente da expressão de CD26. Observou-se uma redução significativa nas células CD34+ e AC133+ de expressão de CD26 após apenas 20 horas de incubação com nicotinamida.

Mais importante, a nicotinamida mostrou-se eficaz no aprimoramento da

funcionalidade de moléculas fundamentais para o processo de ligação celular e parada. Aliás, a avaliação de potencial de migração celular in vitro após exposição à nicotinamida mostrou que a nicotinamida melhorou a migração induzível por CXCL12 e ligação mediada por VLA-4 e retenção sobre VCAM-1 em células transplantáveis cultivadas com nicotinamida (vide Exemplo 3 abaixo). Já que os processos de migração celular são mediados por pares "de reconhecimento" como VLA-4 e VCAM-1 em uma ampla variedade de células, este surpreendente achado indica que a nicotinamida e os derivados e análogos da nicotinamida podem ser eficazes na melhora da ligação e retenção, essenciais para a habilidade de células transplantadas migrarem até o local de reparo com êxito, enxertar e repovoar tecidos hospedeiros, para células de diversas origens e estágios de diferenciação.

Experimentos de transplantação real in vivo com células tratadas com nicotinamida forneceram evidências conclusivas para o efeito de nicotinamida sobre potencial de colonização celular. O Exemplo 2 abaixo mostra que a exposição de células mononucleadas à nicotinamida antes da transplantação em camundongos NOD/SCID aumentou em seis vezes a migração à medula espinhal comparada a células idênticas cultivadas sem nicotinamida. Ademais, o Exemplo 4 abaixo mostra que em doses claramente subideais de células, enquanto células cultivadas controladas não repovoaram a medula óssea em camundongos NOD/SCID, a transplantação de células tratadas com nicotinamida resultou em um alto grau de pega e

repovoamento de sucesso.

Unidos, estes resultados sugerem uma nova função para a nicotinamida na colonização celular a, como tal, em transplante celular.

5 Assim, de acordo com um aspecto da presente invenção, há um método de aprimoramento de potencial de colonização celular, o método que compreende ex-vivo ou in vivo submeter uma população de células a uma quantidade de nicotinamida para um período de tempo
10 suficiente para aprimorar o potencial de colonização celular.

Conforme utilizado no presente, a frase "potencial de melhora de enxerto celular" refere-se a uma melhora na eficácia, qualidade ou rapidez de
15 transplante celular que pode ser resultante da melhora na migração ao tecido final, melhor adesão, redução de rejeição e etc. Os métodos para avaliar o potencial de pega celular incluem, por exemplo, migração celular e outras técnicas in vitro, e avaliação radiológica, histológica e/ou imunológica
20 de tecidos e órgãos a partir de transplantação in vivo, conforme descrito em detalhes adiante. Um auto potencial de renovação de células-tronco pode ser determinado in vitro por formação de colônia a longo prazo (LTC-CFUc), ou por pega in vivo no modelo de camundongo SCID-Hu. O modelo de
25 camundongo SCID-Hu emprega camundongos C.B-17 scid/scid (SCID) transplantados com tecido do timo e fígado fetal humano ou tecido de MO fetal e fornece um modelo apropriado para a avaliação de supostas células-tronco humanas

hematopoiéticas. Devido à reconstituição de camundongos SCID com tecido fetal humano, o modelo proporciona a proliferação de células-tronco, neste caso células-tronco humanas hematopoiéticas para proliferar, e trabalha no microambiente hematopoiético de origem humana. Camundongos são geralmente irradiados, depois as células-tronco entregues aos enxertos, e a reconstituição é medida por qualquer método, inclusive FACS e imunohistoquímica de órgãos repovoados (Humeau L., et al Blood (1997) 90:3496; vide também Materiais e Métodos 10 Experimentais abaixo).

Conforme utilizado no presente, o termo "ex vivo" refere-se a um processo em que células são removidas de um organismo vivo e são propagadas para fora do organismo (por exemplo, em um tubo de teste).

Conforme utilizado no presente, o termo "in vitro" refere-se a um processo em que células originárias de uma linhagem ou linhagens celulares (como células neurais NTERA2, linhas de células embrionárias, etc.) mantidas em laboratório, são manipuladas 20 fora de um organismo. Estas linhas de células são frequentemente células imortalizadas.

Conforme utilizado no presente, a frase "população de células" refere-se a uma população isolada homogênea ou heterogênea de células, 25 abrangendo populações de células adequadas para transplante. Em uma configuração preferida, ao menos uma porção da população de células deste aspecto da presente invenção expressa CD26 ou VLA-4 na superfície celular.

Conforme utilizado no presente, a frase "células-tronco" refere-se tanto à população celular renovável mais nova para geração de massa celular em um tecido ou corpo quanto às primeiras células progenitoras, que são, de certa forma, mais diferenciadas, embora não estejam comprometidas e possam rapidamente transformar-se em parte da população celular renovável mais nova.

Conforme utilizado no presente, as frases "célula não-tronco", "não-progenitora" e "comprometida" referem-se a células em vários estágios de diferenciação, que geralmente deixaram de deter a habilidade de transformação em parte da população celular renovável mais nova. Os métodos de cultura ex-vivo de células-tronco, não-tronco, não progenitoras comprometidas são bem conhecidos na técnica de cultura celular. Para este efeito, consulte, por exemplo, o livro Culture of Animal Cells - A manual of Basic Technique, de Freshney, Wiley-Liss, NY (1994), Terceira Edição, cujos ensinamentos estão aqui incorporados como referência.

A população de células da presente invenção pode ser a partir de doador autólogo ou não-autólogo (alogênico ou xenogênico).

Em uma configuração preferida, as células para transplante são células-tronco ou progenitoras, e a fonte da população de células-tronco é uma preparação celular mononucleada não fracionada, sem ser enriquecida para CD34+ ou outras células-tronco

hematopoiéticas. Em outra configuração, as células-tronco são identificadas por marcadores de células-tronco tais como CD34+, CD34+/CD38-, CD34+/Lin-, e outros marcadores de células-tronco conhecidos na técnica. Ainda, em outra configuração, a fonte da população de células-tronco são células-tronco enriquecidas para células-tronco hematopoiéticas por seleção de acordo com os marcadores de células-tronco.

Por exemplo, as células-tronco da presente invenção podem ser derivadas a partir de uma fonte selecionada do grupo que consiste em células hematopoiéticas, células do sangue do cordão umbilical e células de sangue periférico mobilizadas.

Conforme utilizado no presente, "nicotinamida" refere-se à nicotinamida, assim como a produtos derivados da nicotinamida, análogos da mesma e metabolitos de nicotinamida ou análogos de nicotinamida como, por exemplo, NAD, NADH e NADPH.

Conforme utilizado no presente, "análogo de nicotinamida" refere-se a qualquer molécula cuja ação sabe-se ser similar à da nicotinamida. Exemplos representativos de análogos de nicotinamida incluem, mas não se limitam a benzamida, nicotinatioamida (o análogo tiol de nicotinamida), ácido nicotínico e ácido α-amino-3-indolepropiónico.

Conforme utilizado no presente, o termo "indivíduo" refere-se a um indivíduo mamífero, preferivelmente um ser humano.

A frase "uma nicotinamida ou um derivado análogo de nicotinamida" refere-se a qualquer derivado estrutural de nicotinamida ou de um análogo da substância. Exemplos de tais derivados compreendem, sem se limitar a, substitutos de benzamidas, de nicotinamidas e nicotinatioamidas e N-substitutos de nicotinamidas e nicotinatioamidas.

Adicionalmente ou alternativamente, a mobilização de células-tronco pode ser afetada antes da coleta de células para transplante de células-tronco utilizando agentes mobilizantes bem-conhecidos na técnica. Geralmente, o processo de mobilização é iniciado por ativação de neutrófilos e osteoclastos induzida por estresse por quimioterapia e repetida estimulação com citocinas tais como fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), resultando no alastramento e liberação do fator de célula-tronco (SCF) ligado à membrana, proliferação de células progenitoras, assim como ativação e/ou degradação de moléculas de adesão. Agentes mobilizantes que podem ser usados de acordo com a presente invenção incluem, mas não se limitam a agentes nocivos ao DNA, agentes quimioterapêuticos únicos (por exemplo, ciclofosfamida), regimes de quimioterapia combinada [por exemplo, ifosfamida, carboplatina e etoposida (GELO) e metilprednisolona, ara-c e cisplatina (ESHAP)], citocinas como G-CSF, GM-CSF, SCF ligante FLT-3, e quimiocinas tais como IL-8, MIP-1 α , Gro β e SDF-1. O modo de administração, assim como o intervalo de tempo necessário para alcançar a

mobilização e os tipos de células mobilizadas dependem das moléculas utilizadas. Por exemplo, G-CSF é geralmente administrado diariamente como uma dose de 5-10 µg/gk por 5-10 dias, em monoterapia e após a terapia. O ajuste do regime 5 de mobilização é feito pelo médico e revisado em Cottker-Fox et al. (2003) Hematology 419-437.

Os métodos de preparação de células para transplante para transplante são bem conhecidos na técnicas. Para preparação de células não-tronco, podem 10 ser obtidas células a partir tecido doador por dissociação de células individuais a partir da matriz extracelular de conexão do tecido.

É retirado tecido a partir de uma região particular utilizando um procedimento estéril e 15 as células são dissociadas - utilizando qualquer método conhecido na técnica, inclusive tratamento com enzimas como tripsina, colagenase, DNase, etc, ou utilizando métodos físicos de dissociação tais como um instrumento rombo.

Relatos recentes demonstraram 20 a capacidade de células-tronco, transplantadas ou transfundidas, de aumentar a regeneração em tecido não-homólogo, diverso daquele de onde as células-tronco foram derivadas. Por exemplo, foram observadas miogênese e angiogênese aumentadas no miocárdio infartado após a infusão 25 de células-tronco de medula óssea (Tse et al., Lancet 2003, 361:47-79, Jackson et al., J Clin Invest 2001; 107:1395-402, Orlic et al., Nature 2001; 410:701-5; Lee et al., Cell Cycle 2005; 4:861-64, Nagaya et al., Am J Heart Circ Phys 2004;

287:H2670-76). Outros estudos demonstraram que as células-tronco de medula óssea, de endotélio e de músculo esquelético são benéficas para a lesão renal isquêmica (Togel et al., AJP Renal Phys 2005; 289:F31-F42 e Arriero et al., AMJ Ren Phys 2004; 287:F621-27).

Terapia gênica: para uma terapia gênica bem-sucedida a longo prazo, uma alta freqüência de células geneticamente modificadas com transgenes integrados estavelmente em seu genoma é um requisito obrigatório. No tecido da medula óssea, por exemplo, enquanto a maioria das células é de progenitores e precursores cíclicos, as células-tronco constituem somente uma pequena fração da população de células, e a maioria delas está em um estado quiescente, não-cíclico. Vetores virais (p.ex., retrovirais) necessitam de divisão celular ativa para a integração do transgene no genoma hospedeiro. Portanto, a transferência de genes em células-tronco jovens é altamente ineficiente. A capacidade de armazenar e processar uma população selecionada de células ex-vivo e de melhorar seu potencial de migração diferencial e enxerto prepararia para uma probabilidade aumentada de uso bem-sucedido do transplante de células geneticamente modificadas [Palmeter Proc Natl Acad Sci USA 91(4):1219-1223, (1994)].

Imunoterapia adotiva: sub-
25 populações linfóides definidas e expandidas ex-vivo foram estudadas e utilizadas em imunoterapia adotiva de vários tumores, imunodeficiências, doenças virais e genéticas [Freedman Nature Medicine 2:46, (1996); Heslop Nature

Medicine 2:551, (1996); Proti Cancer Res 56:1210, (1996)].

O tratamento melhora a resposta imune adquirida ou substitui as funções deficientes. Esta abordagem foi explorada clinicamente por 5 Rosenberg et al. [Rosenberg J Natl Cancer Inst. 85: 622, 1993], utilizando um grande número de células autólogas e também células T killer não-específicas alogênicas expandidas ex-vivo e, subseqüentemente, linfócitos infiltrantes de tumor expandidos ex-vivo.

10 Células apresentadoras de antígenos funcionalmente ativas também podem ser desenvolvidas a partir de uma população inicial de células CD34⁺ PB em culturas contendo citocina. Estas células podem apresentar抗ígenos protéicos solúveis para células T autólogas in vitro e, assim, oferecer novas possibilidades para a imunoterapia de doenças residuais mínimas após quimioterapia de altas doses. A expansão ex-vivo de células dentríticas apresentadoras de antígenos também foi estudada, 15 e representa outra aplicação promissora da tecnologia 20 atualmente proposta [Bernhard Cancer Res 10:99, (1995); Fisch Eur J Immunol 26:595, (1996); Siena Expt Hematol 23:1463, (1996)].

Outros exemplos de aplicações ex-vivo:

25 Aplicações adicionais de células diferenciadas, não células-tronco, além de tratamento com células-tronco e células progenitoras à base de nicotinamida, incluem regeneração cutânea, regeneração

hepática, regeneração muscular, estimulação do crescimento ósseo para aplicações em osteoporose e transplante de condrócitos/condroblastos e/ou células sinoviais para o tratamento de doenças articulares e artríticas.

5 De acordo com um aspecto da presente invenção, o contato ex-vivo de populações celulares com nicotinamida, de acordo com as características acima descritas, pode ser utilizado para preparar uma população de células-tronco ou de não células-tronco ex-vivo ou in-vitro 10 para implantar as células em um órgão de um indivíduo que delas necessite.

As células da presente invenção podem ser transplantadas através de injeção direta em órgão, injeção na corrente sanguínea, injeção 15 intraperitoneal, etc. Métodos adequados de transplante podem ser determinados através do monitoramento da migração diferencial e enxerto das células implantadas no órgão desejado, a expressão dos genes ou marcadores específicos ao órgão desejados, e a função do órgão derivado do indivíduo.

20 No pâncreas, por exemplo, a manutenção da euglicemia, a secreção de insulina e/ou peptídeo C podem ser um parâmetro para a restauração da função em um animal hospedeiro diabético após a terapia de substituição celular revelada abaixo. No fígado, por 25 exemplo, a síntese de albumina pode ser monitorada.

As populações celulares da presente invenção podem ser proporcionadas por si mesmas, juntamente com o meio de cultura contendo as mesmas,

isoladas do meio de cultura, e combinadas com um transportador aceitável da perspectiva farmacêutica, e também com outros agentes que possam promover o enxerto celular e/ou a função orgânica (p.ex., agentes 5 imunossupressores, antibióticos, fator de crescimento). Por conseguinte, as populações celulares da invenção podem ser administradas em transportador ou diluentes aceitáveis do ponto de vista farmacêutico, como soluções-tampão salinas e aquosas esterilizadas. O uso de tais transportadores e 10 diluentes é bastante conhecido na técnica.

As composições da presente invenção podem ser apresentadas, se desejado, em embalagem ou dispositivo dispensador, como um kit aprovado pelo FDA (Agência Norte-americana para Drogas e Alimentos), que pode 15 conter uma ou mais formas de administração de unidade contendo a substância ativa (p. ex., células). A embalagem ou dispositivo dispensador também podem ser acompanhados de um aviso na forma prescrita por agência governamental que regule a produção, uso ou venda de produtos farmacêuticos, 20 aviso este que reflete a aprovação, pela agencia, da forma das composições para uso humano ou veterinário. Tal aviso pode incluir, por exemplo, a rotulagem aprovada pela Agência Norte-americana para Drogas e Alimentos para remédios controlados ou bulas aprovadas. As composições que contenham 25 uma preparação da invenção formulada em transportador aceitável do ponto de vista farmacêutico também pode ser preparada, colocada em recipiente apropriado e rotulado para tratamento de doença, conforme detalhado acima.

As células preparadas de acordo com os métodos da presente invenção podem ser administradas ao indivíduo por si mesmas ou em composição farmacêutica em que seja misturada com excipientes ou 5 transportadores adequados.

Conforme empregado neste documento, uma "composição farmacêutica" se refere a uma preparação de uma ou mais substâncias ativas descritas aqui com outros componentes químicos, como transportadores ou 10 excipientes adequados do ponto de vista fisiológico. O propósito de uma composição farmacêutica é facilitar a administração de um componente a um organismo.

Doravante, as frases "transportador aceitável do ponto de vista fisiológico" e 15 "transportador aceitável do ponto de vista farmacêutico", que podem ser empregadas de modo intercambiável, se referem a um transportador ou diluente que não cause irritação significativa a um organismo e que não anule a atividade e as propriedades biológicas do composto administrado. Um 20 adjuvante está incluído sob estas frases.

Neste documento, o termo "excipiente" refere-se a uma substância inerte adicionada a uma composição farmacêutica para facilitar a administração de uma substância ativa. Exemplos de excipientes incluem, 25 sem limitação, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, vários açúcares e tipos de amido, derivados de celulose, gelatina, óleos vegetais e polietilenoglicóis.

As técnicas para formulação e

administração de drogas podem ser encontradas na última edição de "Remington's Pharmaceutical Sciences", da editora Mack Publishing Co., de Easton, na Pensilvânia/EUA, que neste documento é plenamente incorporada como referência.

5 As vias de administração adequadas podem incluir, por exemplo, administração oral, retal, transmucosal, sobretudo nasal, intestinal ou parenteral, entre elas injeção intramuscular, subcutânea e intramedular, além de injeção intratecal, direta 10 intraventricular, intravenosa, intraperitoneal, intranasal ou intraocular.

Alternadamente, pode-se administrar a composição farmacêutica de modo local, em vez de modo sistêmico, por exemplo, através da injeção da 15 composição farmacêutica diretamente na região do tecido de um paciente.

As composições farmacêuticas para uso de acordo com a presente invenção podem ser formuladas de maneira convencional, portanto, usando um ou 20 mais transportadores aceitáveis do ponto de vista fisiológico, incluindo excipientes e auxiliares que facilitam o processamento das substâncias ativas nas preparações que podem ser usadas farmaceuticamente. A formulação apropriada depende da via de administração 25 escolhida.

Para a injeção, as substâncias ativas da composição farmacêutica podem ser formuladas em soluções aquosas, de preferência em tampão fisiologicamente

compatível, tais como: solução de Hank, solução de Ringer ou tampão de sal fisiológico. Para a administração transmucosal, penetrantes adequados para a barreira a ser permeada são empregados na formulação. Tais penetrantes são 5 geralmente conhecidos na técnica.

Entre as composições farmacêuticas adequadas para uso no contexto da presente invenção estão as composições nas quais as substâncias ativas estão contidas em uma quantidade eficaz para atingir 10 a finalidade visada. De maneira mais específica, uma "quantidade terapeuticamente eficaz" significa uma quantidade de substâncias ativas (p.ex., um construto de ácido nucléico) eficaz a fim de prevenir, aliviar ou melhorar os sintomas de uma doença (p. e., isquemia) ou 15 prolongar a sobrevida de um paciente sob tratamento.

A determinação de uma quantidade terapeuticamente eficaz está bem dentro da capacidade daquelas especializadas na técnica, especialmente à luz da revelação detalhada fornecida neste documento.

20 Para qualquer preparação empregada nos métodos da invenção, a dosagem ou a quantidade terapeuticamente eficaz pode ser inicialmente estimada a partir de análises in vitro e de cultura celular. Por exemplo, uma dose pode ser formulada em modelos animais para 25 se atingir a concentração ou título desejado. Tais informações podem ser utilizadas para determinar de modo mais preciso as doses úteis em humanos.

A toxicidade e a eficácia

terapêutica das substâncias ativas aqui descritas podem ser determinadas através de procedimentos farmacêuticos padrão *in vitro*, em culturas celulares ou cobaias. Os dados obtidos a partir destas análises *in vitro* e de cultura celular e de 5 estudos em animais podem ser utilizados na formulação de uma gama de dosagens para uso em humanos. A dosagem pode variar dependendo da forma de administração empregada; a via de administração pode ser escolhida pelo médico tendo em vista a condição do paciente. (Ver, p. ex., Fingl, E. et al. 10 (1975), "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Chp. 1, p. 1.)

Dependendo da severidade e da receptividade da condição a ser tratada, a dosagem pode ser através de uma única ou de uma pluralidade de 15 administrações, com o curso do tratamento durando de vários dias a várias semanas, ou até que a cura ou a diminuição do estado da doença sejam atingidos.

A quantidade de uma composição a ser administrada será dependente, é claro, do indivíduo 20 que está sendo tratado, da severidade da afecção, do modo de administração, do juízo do médico que prescreve o tratamento, etc.

Outros objetos, vantagens e características originais da presente invenção tornar-se-ão 25 óbvios para alguém comumente versado na técnica após o exame dos seguintes exemplos, que não tem a intenção de serem limitantes. Além disso, cada uma das várias configurações e aspectos da presente invenção, conforme delineado acima e

solicitado na seção de reivindicações abaixo, encontra apoio empírico nos exemplos a seguir.

EXEMPLOS

A referência agora é feita aos 5 seguintes exemplos que, juntamente com as descrições acima, ilustram a invenção de modo não limitante.

Geralmente, a nomenclatura empregada neste documento e os procedimentos laboratoriais utilizados na presente invenção abarcam as tecnologias 10 moleculares, bioquímicas, microbiológicas e de DNA recombinante. Tais tecnologias encontram-se perfeitamente explicadas na literatura. Ver, por exemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual", Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology", volumes I-III, 15 Ausubel, R.M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, 20 New York; Birren et al. (eds.), "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologias apresentadas nas patentes norte-americanas de números 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 e 5.272.057; "Cell Biology: 25 A Laboratory Handbook", Volumes I-III, Cellis, J.E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" (8. edição), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell e Shiigi (eds.), "Selected Methods in Cellular Immunology", W.H.

Freeman and Co., New York, (1980); os imunoensaios disponíveis estão amplamente descritos na literatura científica e de patentes, ver, por exemplo, as patentes norte-americanas de números 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 5 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 e 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis", Gait, M.J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization", Hames, B.D. e Higgins, S.J., ed. (1985); 10 "Transcription and Translation", Hames, B.D. e Higgins, S.J., ed. (1984); "Animal Cell Culture", Freshney, R.L., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes", IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning", Perbal, B., (1984) e "Methods in Enzymology", Vol. 1-317, Academic Press; "PCR 15 Protocols: A Guide To Methods and Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual", CSILL Press (1996); todas elas incorporadas como referência como se plenamente expostas aqui. Outras 20 referências gerais são fornecidas ao longo deste documento. Acredita-se que os procedimentos a esse respeito são bastante conhecidos na técnica, sendo fornecidos para a conveniência do leitor. Todas as informações contidas a esse respeito são aqui incorporadas como referência.

25 MATERIAIS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Amostras de sangue do cordão -
as células foram obtidas a partir do sangue do cordão
umbilical após o parto normal ao final da gestação (foi

obtido o termo de consentimento livre e esclarecido). As amostras foram coletadas e congeladas de acordo com Rubinstein et al. [Rubinstein et al., Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92 (22):10119-10122] nas 24 horas do pós-parto. Antes 5 do uso, as células foram degeladas em tampão com Dextran (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) contendo albumina de soro humano a 2,5% (HAS, Bayer Corp. Elkhart, Indiana, EUA), divididas em camadas em um gradiente de Ficoll-Hypaque (1,077 g/Ml; Sigma) e centrifugadas a 800 × g durante 30 10 minutos. As células mononucleares da camada de interface foram coletadas e enxaguadas três vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS, Biological Industries) contendo albumina de soro humano a 0,5%. Para purificar as células CD34+, a fração de células mononucleares foi submetida a 15 dois ciclos de separação imunomagnética de partículas, utilizando um "kit de isolamento de células progenitoras CD34 Minimacs" (Miltenyl Biotec Bergish, Gladbach, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A pureza da população de CD34+ assim obtida foi de 95-98%, 20 conforme avaliado por citometria de fluxo.

Análise de FACS [separação celular ativada por fluorescência] de células CD34+ - porcentagens de células progenitoras positivas para CD26 foram determinadas por coloração de células CD34+ com FITC 25 [isotiocianato de fluoresceína] anti-CD26 adquirido junto a Becton Dickinson.

Expansão ex vivo - as células CD34+ purificadas foram cultivadas em bolsas de cultura

(American Fluoroseal Co., Gaithersburg, Maryland) a 1×10^4 células/ml em meio MEM α , soro fetal bovino (FCS) a 10% e citocinas: trombopoetina (TPO), interleucina-6 (IL-6), ligando FLT-3 e fator de células-tronco (SCF), cada um deles em concentração final de 50 ng/ml (Perpo Tech, Inc., Rocky Hill, New Jersey), com ou sem 5mM de nicotinamida (NA) (Sigma Aldrich, Milwaukee, Wisconsin) e incubadas a 37 °C em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ no ar. Estudos preliminares realizados com várias concentrações de NA (1 - 10 mM) indicaram que em combinação com as 4 citocinas, 5 mM era a concentração mais eficiente de NA (dados não exibidos). Até a semana 3, as culturas foram cobertas semanalmente com o mesmo volume de meio fresco e então, semanalmente despopuladas pela metade. A contagem de células, a análise de unidades formadoras de colônia (UFC) e a análise de imunofenótipo foram realizadas conforme descrito abaixo.

Imunofenotipagem de células CD34+ - as células CD34+ reisoladas em MiniMACS foram enxaguadas em solução salina tamponada com fosfato contendo albumina de soro bovino a 1% e sofreram coloração dupla (a 4 °C durante 30 minutos) com anticorpos anti-CD34 conjugados com PE [ficoeritrina] e com FITC [isotiocianato de fluoresceína] para CXCR4, VLA-4 (Chemicon Intnl, Inc., Temecula, Califórnia, EUA), LFA-1 (produto IQ), CD38 ou com uma mistura de anticorpos conjugados com FITC contra抗ígenos de diferenciação (CD38, CD33, CD14, CD15, CD3, CD61, CD19) para determinação de células CD34+Lin-.

(Anticorpos para CD34, CD38 e CD61 foram adquiridas junto a DAKO Glostrup, Corp., Carpenteria, Califórnia, EUA, enquanto os outros o foram junto a Becton Dickinson and Co., San Jose, Califórnia, EUA). As células foram então enxaguadas no 5 tampão acima e analisadas usando-se um citômetro de fluxo FACScalibur® (Becton Dickinson and Co., San Jose, Califórnia). A emissão de 10^4 células foi medida utilizando-
se amplificação logarítmica e analisada utilizando-se software CellQuest (Becton Dickinson and Co., San Jose, 10 Califórnia, EUA). Os resultados da análise de FACS [separação celular ativada por fluorescência] são apresentados como porcentagem de células CD34+. O número absoluto de células CD34+CD38- e CD34+Lin- foi calculado a partir do número total de células CD34+ na cultura.

15 Rotulagem de CFSE
[Carboxifluoresceína Succimidil Éster] - células cultivadas ou não-cultivadas enxaguadas e recolocadas em suspensão a menos de 10^7 células/mL em meio livre de soro. Carboxifluoresceína succimidil éster (Molecular Probes, 20 Inc., Eugene, Oregon, EUA) foi adicionado a uma concentração final de 5 μ g/ml e as células foram incubadas durante 10 minutos a 37 °C. A absorção do corante foi interrompida pela adição de soro fetal bovino a 10%. Após a rotulagem, as células foram enxaguadas três vezes em solução salina 25 tamponada com fosfato complementada com soro fetal bovino a 10% e analisada através de citometria de fluxo para intensidade de fluorescência, e depois injetada por via intravenosa em camundongos NOD/SCID [camundongos diabéticos

não obesos com imunodeficiência severa combinada] submetidos à irradiação subletal (10-20 milhões de células por camundongo).

Ensaio de Migração In Vitro -

5 RPMI (migração aleatória) mais soro fetal bovino a 10% (0,6 ml) contendo 100 ng/ml de CXCL12 (R&D Systems) foi disposta na câmara inferior de uma placa de cultura "transwell" de 24 orifícios modelo Costar (Corning, Inc., Corning, New York). As células (2×10^5) em meio de 100 µl foram introduzidas na
 10 câmara superior, sobre uma membrana porosa (poro de 5µm). Após 4 horas, as células foram coletadas de ambas as câmaras e contadas através de citometria de fluxo (FACSSort, Becton Dickinson and Co., San Jose, Califórnia, EUA). Migração espontânea migração controlada foi realizada sem CXCL12 na
 15 câmara inferior.

Análise in vivo de migração diferencial - camundongos NOD/SCID (8-10 semanas de idade) (Harlan Ltd., Israel) foram expostos à irradiação subletal (a 375 cGy a 67 cGy/min) e inoculados 24 horas depois na
 20 veia da cauda ou com células cultivadas rotuladas com CFSE [carboxifluoresceína succimidil éster] ou com células do sangue do cordão umbilical não-cultivadas. Os camundongos foram sacrificados 24 horas após a injeção e amostras de medula óssea foram coletadas escorrendo seus fêmures e
 25 tíbias com IMDM a 4 °C. A migração diferencial de células humanas foi detectada por citometria de fluxo através da visualização de células contrastadas com CFSE contra um fundo de células murídeas não-rotuladas. A fluorescência

brilhante de CFSE foi suficiente para separar as células humanas rotuladas das células murideas não-rotuladas em pelo menos 1 log. A fim de quantificar a migração diferencial de células progenitoras humanas, as células de medula óssea foram tingidas com anticorpos monoclonais CD34 anti-humanos conjugados com APC e células CFSE⁺CD34⁺ (progenitor humano) foram enumeradas. Para cada amostra, 100.000 eventos foram registrados e analisados.

Transplante de células CD34⁺

10 humanas em camundongos NOD/SCID - camundongos NOD/SCID foram criados e mantidos em gaiolas intraventiladas esterilizadas (Techniplast, Bugugiatte, Itália). Camundongos de 8 semanas foram expostos à irradiação subletal, conforme descrito acima. Os camundongos foram então inoculados através da veia 15 da cauda com células CD34⁺ frescas, purificadas e derivadas do sangue do cordão umbilical ou toda a sua prole após 3 semanas em cultura. A fim de evitar a variabilidade do doador, células CD34⁺ derivadas do sangue do cordão umbilical de várias unidades foram agrupadas e 20 utilizadas para culturas de expansão e também para injeção de grupo. Os camundongos foram sacrificados na semana 4 e amostras de medula óssea foram coletadas escorrendo seus fêmures e tibias com IMDM a 4 °C. Análises citométricas de fluxo das células de medula 25 NOD/SCID foram realizadas conforme descrito acima, utilizando-se anticorpos monoclonais contra antígenos humanos de diferenciação de leucócitos a fim de identificar o enxerto de células humanas.

Quantificação de células de repopulação de SCID (SRCs) - as freqüências das células de SRCs foram quantificadas através de análise de diluição limitante e aplicação de estatísticas de Poisson ao modelo de impacto único, conforme previamente descrito. Os camundongos foram marcados como positivamente enxertados se 0,5% de suas células de medula óssea expressasse CD45 humano. As freqüências de SRCs e a comparação estatística entre as populações individuais foram calculadas através de estimador de probabilidade máxima usando o software L-Calc (StemCell Technologies, Vancouver, Colúmbia Britânica, Canadá).

Experimentos de fluxo de corte - a proteína humana VCAM-1 solúvel purificada de sete domínios, sVCAM-1 foi misturada em meio de cobertura (solução salina tamponada com fosfato tamponada com bicarbonato de sódio a 20mM e pH de 8,5) com uma quantidade fixa de transportador (albumina de soro humano a 2 μ g/ml) e absorvida como sítios de 10 μ l em placas de poliestireno (Becton Dickinson and Co., San Jose, Califórnia, EUA) durante 2 horas a 37 °C, sozinha ou com as quantidades indicadas de quimiocinas intactas ou inativadas por calor. As placas foram enxaguadas e bloqueadas com albumina de soro humano (20 mg/ml). As densidades do sítio VCAM-1 foram avaliadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-VCAM-1 rotulados T, 4B9. As monocamadas de células não-cultivadas e de células após a cultura com ou sem nicotinamida e substratos cobertos com quimiocina/VCAM-1 foram montadas

como a superfície inferior da câmara de fluxo (distância de 260 μm) e intensamente enxaguadas com meio de ligação. A câmara de fluxo foi montada na plataforma de um microscópio invertido de contraste de fase (Diaphot 300; Nikon Europe BV, Badhoevedorp, Holanda). Todos os experimentos de fluxos foram conduzidos a 37 °C. As células foram difundidas a 10^6 células/mL na câmara à taxa de fluxo desejada gerada com uma bomba de seringa mecanizada. A duração de todas as perfusões celulares foi registrada em um videoteipe com câmara de vídeo de longa integração LIS-700 CCD (Applitech Rigicam, Israel) e gravador de vídeo SVHS de espaços de tempo (AG-6730; Panasonic, Japão). Todas as interações celulares com os substratos adesivos foram determinadas por rastreamento manual dos movimentos de cada célula junto com os caminhos de campo de 0,9 mm durante 1 minuto. As interações celulares com superfícies caracterizadas por VCAM-1 foram > 95% dependentes de integrina $\alpha 4$. Em cada experimento, todos os eventos foram normalizados para uma população celular constante fluindo na proximidade imediata do substrato. A freqüência de cada categoria de ligação foi expressa em porcentagem de unidades (evento \times célula $^{-1}$ \times 10 2); 1% de unidades medidas a 0,5, 1 e 1,5 dyn/cm 2 correspondeu à taxa de ligação de $1,5 \times 10^{-3}$, 3×10^{-3} e $4,5 \times 10^{-3}$ eventos \times células $^{-1}$ mm $^{-1}$ s $^{-1}$, respectivamente, expressas como variação \pm média ou desvio padrão.

paramétrico dos sinais de Wilcoxon foi aplicado a fim de testar as diferenças entre os grupos em estudo. Todos os testes aplicados foram bilaterais e um valor $p \leq 5\%$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados foram 5 analisados utilizando-se software SAS (SAS Institute, Cary, North Carolina).

RESULTADOS EXPERIMENTAIS

EXEMPLO 1

Nicotinamida regula
10 negativamente a expressão de CD26/dipeptidil peptidas IV em células CD34+

O efeito da incubação de curto prazo com nicotinamida na expressão da membrana CD26 de 15 células-tronco hematopoiéticas foi abordado através de análise de FACS [separação celular ativada por fluorescência].

Células CD34+ recém-purificadas foram analisadas por FACS quanto à expressão de CD26 (T-0) e em seguida incubadas +/- Nicotinamida 5 mM 20 durante 20 horas (T-20 horas) e novamente analisadas por FACS. Conforme demonstrado no experimento duplicado resumido na Tabela 1 abaixo, após as 20 horas de incubação (T-20) na presença de Nicotinamida, a expressão de CD26 foi reduzida 25 significativamente pela presença de Nicotinamida (redução de 2-3 vezes) em comparação com células mantidas durante 20 horas na ausência de Nicotinamida além de células CD34+ recém-purificadas (T-0).

Tabela 1

	T-0	Células CD26+ (%)	
		Controle	+ Nicotinamida
Exp. 1	8,5	5	2,7
Exp. 2	10	12	6

EXEMPLO 2

Nicotinamida aumenta a migração diferencial de medula óssea de células cultivadas

5 A eficácia reduzida de enxerto de células cultivadas tem sido atribuída, pelo menos em parte, a um defeito em sua capacidade de migração diferencial em relação às células não-cultivadas (Szilvassy, S.J., et al., Blood, 2000; 95: 2829-37). A fim de avaliar o
10 efeito da nicotinamida sobre a migração diferencial de células cultivadas, camundongos NOD/SCID foram transplantados tanto com 10×10^6 células mononucleares não-cultivadas (MNC), contendo 5×10^4 células CD34+ (células CD34+ a 0,5%), quanto com sua prole total após 3 semanas em
15 cultura com citocinas, com ou sem nicotinamida, cada transplante contendo 180×10^4 células CD34+. Antes do transplante, as células foram rotuladas com CFSE. Vinte e quatro horas após o transplante, o total de células rotuladas com CFSE e as células CD34+ rotuladas com CFSE que
20 migrou para a medula óssea do camundongo dos camundongos receptores foi quantificado através de análise de FACS.

Muito embora o mesmo número de células e células CD34+ fosse transplantado de ambos os grupos cultivados, a migração diferencial de células CD34+ tratadas com nicotinamida foi 6 vezes maior, enquanto a migração diferencial de células CD34+ sem exposição à

nicotinamida foi apenas 2 vezes maior em relação à migração diferencial de células CD34+ não-cultivadas ($n=21$, $p<0,05$) (figura 1a). A migração diferencial de células cultivadas (MNC) foi 2 vezes maior com células tratadas com 5 nicotinamida, em comparação com células não tratadas com nicotinamida, e semelhante à migração diferencial de MNC não-cultivadas ($n=21$, $p<0,05$) (figura 1b). As figuras 1c-1i mostram gráficos de pontos da análise de FACS de camundongos típicos transplantados com células cultivadas ou não-10 cultivadas.

Figura 1a. A orientação das células cultivadas (MNC) foi 2 vezes maior com células tratadas com nicotinamida em comparação com células não tratadas com nicotinamida e similar à orientação de MNC não cultivadas ($n=21$, $p<0,05$) (Fig. 1b). As figuras 1c-1i mostram o traçado pontilhado de análise dos camundongos FACS representativos transplantados com células não-cultivadas ou cultivadas.

EXEMPLO 2

20 A nicotinamida aumenta a funcionalidade dos receptores de quimoquina e das moléculas de adesão

Sugeriu-se que alterações na quimoquina e nas moléculas de adesão, seja na expressão, seja na funcionalidade, causam um defeito de retorno em 25 células cultivadas CD34+, já que a vinculação das células com ligações específicas de "atração" é crítica para a passagem eficiente das células da circulação para tecidos-alvo (Foguenne, J., et al. Haematologica, 2005;90:445-51).

Isto é especialmente significativo em vista da ampla distribuição de integrinas e de moléculas de adesão como VLA-4 e LFA-1 por uma variedade de tipos de células (células de músculos, linfócitos, eosinófilos, etc.). Tendo em vista 5 determinar o papel de tal adesão e das moléculas relativas no aprimoramento mediado por nicotinamida da orientação e enxertadura de células, o efeito da nicotinamida na migração in vitro e a funcionalidade da molécula de adesão Antígeno-4 de Ativação Muito Tardia (VLA-4) foram testados.

10 Utilizando um ensaio de migração trans-cavidades, a migração induzida por CXCL12 de células hematopoiéticas cultivadas e não-cultivadas foi testada, avaliando os efeitos da nicotinamida sobre a função da integrina e da molécula de adesão. A CXCL12 estimulou 15 poderosamente a migração de células CD34+ tratadas e não-tratadas (figura 2d). No entanto, a migração induzida pela CXCL12 foi significativamente mais alta em células cultivadas com nicotinamida (citocina + NA) em comparação com as células cultivadas sem nicotinamida ($p>0,02$) ou 20 células não-cultivadas ($p=0,05$) (figura 2). Esses resultados sugerem que o tratamento das células CD34+ com NA pode aumentar potencialmente a resposta da CXCR4 à sua ligação CXCL12, resultando em enxerto aprimorado e em potencial de orientação das células tratadas com nicotinamida.

25 Quando a qualidade funcional da ligação das células às moléculas de adesão foi investigada utilizando-se a análise de fluxo de cisalhamento, o forte efeito da nicotinamida sobre a ligação

mediada por VLA4 e a retenção na VCAM foram revelados. A Figura 3 mostra a percentagem significativamente aprimorada de células inicialmente estabelecidas tratadas com nicotinamida.

5 Assim, os resultados nas Figuras 2 e 3 revelam que o tratamento com nicotinamida das células antes do transplante aumenta a função das moléculas de adesão e relativas à citocina nessas células, aprimora a migração celular e, portanto, aprimora o potencial de 10 transplante da célula, conforme indicado pela maior captura inicial e ligação à VCAM-1 imobilizada e retenção sob um maior fluxo, em comparação com células não-cultivadas ou cultivadas apenas com citocinas.

EXEMPLO 4

15 NA aumentou a capacidade de repopulação da SCID das células cultivadas com citocina

O tratamento com nicotinamida foi testado quanto à capacidade de melhorar a orientação e enxerto de células transplantadas mediante a repopulação de 20 camundongos NOD/SCID. Para avaliar a capacidade de repopulação, os camundongos NOD/SCID foram transplantados com células CD34⁺ não cultivadas (n = 12) em uma variedade de doses a fim de atingir o transplante sub-ótimo e o não-enxerto subsequente em uma parcela dos camundongos ou de sua 25 progênie após uma expansão de 3 semanas com citocinas (n = 12) ou citocinas + NA (n = 13). O enxerto de células humanas foi avaliado 4 semanas após o transplante. Os camundongos foram classificados como enxertados positivamente se 0,5%

das células da medula óssea do recipiente expressavam o antígeno humano CD45 (CD45+). Conforme é mostrado na Figura 4a, o transplante de células 3×10^3 CD34 $^{+}$ não resultou em enxerto nas células não-cultivadas. Similarmente, a progênie de células 3×10^3 CB CD34 $^{+}$ cultivadas com citocinas também falhou em enxertar. No entanto, a presença de nicotinamida na cultura resultou em 50% de enxerto de células 3×10^3 CB CD34 $^{+}$ nos camundongos. Com uma gama de doses de células 6×10^3 (Figura 4b), as novas células CB CD34 $^{+}$ enxertaram em apenas 16,7% dos camundongos, enquanto que a progênie das células 6×10^3 CD34 $^{+}$ cultivadas com citocinas enxertaram em 33,3% dos camundongos. Por contraste, na mesma gama de doses, a progênie de células cultivadas de nicotinamida de citocinas enxertou em 100% dos camundongos (Figura 4b).

A freqüência das células de repopulação SCID (SRCs) foi calculada utilizando-se o estimador de probabilidade máxima descrito acima (Figs. 4c-4e). A freqüência de SRCs dentro das células CD34 $^{+}$ não-cultivadas foi de 1 em 36.756 células (95% de intervalo de confiança [CI], 1/113.366 - 1/11.917) (Fig. 4c). A freqüência de SRC dentro das células cultivadas apenas com citocinas foi de 1 em 19.982 (CI, 1/47.972 - 1/8.323) (Figura 4d) e a freqüência de SRC dentro das células cultivadas na presença de nicotinamida e citocinas foi significativamente mais alta, 1 em 2.620 (CI, 1/5.127 - 1/1.339) (Figura 4e). Portanto, as condições de cultura incluem a nicotinamida apoiada em um número 14 vezes maior de SRCs do que as células não-cultivadas e 7,6 vezes mais

SRCs do que nas células cultivadas apenas com citocinas. A Fig. 4f demonstra a diferença multilinear in vivo das células cultivadas tratadas com NA enxertadas em camundongos NOD/SCID.

5 Efeito da nicotinamida na orientação e enxerto em células tratadas com IL-3: Relatou-se que IL-3 acelera a diferenciação e atenua a capacidade de repopulação dos SCID das células transplantadas. A fim de testar se a nicotinamida modula o potencial de enxertar das 10 células expostas à citocina, o efeito da nicotinamida sobre as células CD34+ derivadas de CB e cultivadas com IL-3 foi avaliado. As experiências de transplante indicaram que o tratamento com nicotinamida de fato aumentou o potencial de repopulação dos SCID de culturas suplementares de IL-3. As 15 experiências de transplante indicaram que o tratamento com nicotinamida de fato aumentou o potencial de repovoamento de SCID de culturas suplementadas com IL-3. A Figura 5a mostra a proporção de enxertadura após a injeção de células 1,25 a 5 x 10⁴. As Figuras 5b-c exibem a enxertadura das células 20 humanas totais (Figura 5b) e das células progenitoras (Figura 5c) após o transplante da dose de células mais baixa nesta experiência (1,25x10⁴ células). Os resultados mostram a presença de células humanas (CD45+) na medula óssea de 5 em 5 camundongos transplantados com células tratadas com 25 nicotinamida, porém em apenas 2 em 5 camundongos com células tratadas apenas com citocina (Figura 5a). A enxertadura de progenitores humanos (CD45+CD34+) quatro semanas após o transplante foi observado apenas nos camundongos

transplantados com células cultivadas com nicotinamida.

Os resultados acima demonstram claramente que a exposição de células à nicotinamida melhora a expressão e a função das células de adesão e integrinas que são críticas para a enxertadura e orientação das células, podendo aumentar o potencial migratório das mesmas, proporcionando uma enxertadura e orientação claramente superiores das células transplantadas. Assim, a nicotinamida pode ser usada para prover populações celulares para transplante, tendo melhorado o potencial de orientação e enxertadura.

Considera-se que certos recursos da invenção que são, por clareza, descritos no contexto de configurações separadas, também podem ser fornecidos em combinação com uma única configuração. Inversamente, vários recursos da invenção que são, por brevidade, descritos no contexto de uma única configuração, também podem ser fornecidos separadamente ou em qualquer subcombinação adequada.

Embora a invenção tenha sido descrita em conjunção com suas configurações específicas, é evidente que muitas alternativas, modificações e variações serão evidentes para aqueles habilitados na técnica. Assim sendo, ela visa abranger todas as alternativas, modificações e variações que incidam no espírito e amplo escopo das reivindicações em anexo. Todas as publicações, patentes e solicitações de patentes e números de Acesso do GenBank mencionados nesta especificação são aqui incorporadas em sua

totalidade por referência a tal especificação, na mesma medida como se cada publicação, patente ou solicitação ou número de Acesso do GenBank fosse específica e individualmente indicado para ser aqui incorporado por 5 referência. Além disso, a citação ou indicação de qualquer referência nesta solicitação não deve ser interpretada como admissão de que tal referência está disponível como técnica anterior à presente invenção.

Os ensinamentos da Solicitação
10 PCT IL03/00064, aqui incorporados por referência como se fossem totalmente aqui apresentados, visam ser excluídos do âmbito da presente invenção e reivindicações em anexo.

LISTA DE REFERÊNCIAS

- Aiuti J. Exp. Med., 1997; 185:111-120
15 Anderlini, P. E Korbling, M., (1997) Stem Cells 15, 9-17
Baggiolini, M., 1998, Nature 392:565
Banasik M. et al., J. Biol. Chem. 1992; 267:1569-1575
Bernhard Cancer Res 10:99, (1995)
Christopherson KW 2nd, et al., Science, 2004 Aug 13;
20 305(5686): 1000-1003
Christopherson KW 2nd, J. Immunol, . 2002; Dec 15;
169(12):7000-7008
Corda D, Di Girolamo M. 2003; 22(9): 1953-1958
de la Cruz X, Lois S, et al., Bioessays. 2005; 27(2):164-75
25 De Roos et al., Transplantation 1997; 63:513-18
Fisch Eur J. Immunol 26: 595, (1996)
Foguenne, J., et al., Haematologica, 2005;90;445-51
Freedman Nature Medicine 2:46, (1996)

- Gagandeep et al., Gene Therapy, 1999;6: 729-36
- Heslop Nature Medicine 2:551 (1996)
- Humeau L., et al. Blood (1997) 90:3496
- Ito et al., Muscle Nerve, 1998; 21:291-7
- 5 Imai Br. J. Haematol. 1999;106:905-911
- Jaime Imitola et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2004 101 (52): 18117-18122
- Kipshidze and Serruys, eds. Londres, UK, 2004
- Lupi R, et al., J. Biol. Chem. 2000;275:9418-9424
- 10 Lupi R, et al., Biochem. J. 2002;367:1-7
- McGrath Dev. Bol. 1999;213:442-456
- Protti Cancer Res 56: 1210, (1996)
- Rankin PW, et al., J. Biol. Chem. 1989; 264:4312-4317
- Roach ML. Methods Mol. Biol. (2002) 185:1
- 15 Siena Expt. Hematol. 23:1463, (1996)
- Shioda et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 95:6331
- Smith AG., Annu. Rev. Cell Dev. Biol. (2001) 17:435
- Smith S. Trends Biochem. Sci. 2001; 26:174-179
- Trounson AO. Reprod. Fertil. Dev. (2001) 13:523
- 20 Ueda K. Hayaishi O, Annu. Rev. Biochem. 1985;54:73-100
- Virág L., Szabó C. Pharm. Reviews. 2002;54:375-429
- Yau L, et al., Eur. J. /Biochem. 2003; 270:101-110

REIVINDICAÇÕES

1. "MÉTODO DE AUMENTAR O POTENCIAL DE IMPLANTE E DE ATRAÇÃO CELULAR", compreendendo, tal método, em se sujeitar uma população de células ex-vivo ou in vitro a uma quantidade de nicotinamida por um período de tempo suficiente para aumentar o potencial de implante e de homing celular, o método caracterizado, ademais, por ao menos um dos seguintes: (i) onde a dita população de células seja uma população de células tronco hematopoiéticas e/ ou uma população de células progenitoras e que o dito período de tempo seja determinado como insuficiente para expansão das células tronco, ou que esteja sob condições insuficientes para a expansão de células tronco e/ ou de células progenitoras; (ii) onde a dita quantidade de nicotinamida e o dito período de tempo sejam determinados como suficientes para diminuir a expressão de CD26 pelas células da dita população celular, porém não o suficiente para expansão de células tronco e/ ou progenitoras; (iii) dita população de células não inclue células hematopoiéticas, células tronco hematopoiéticas, células mononucleares, células progenitoras do fígado fetal, células progenitoras comprometidas, células progenitoras e tronco não hematopoiéticas, ou células progenitoras e tronco embriônicas; (iv) dita sujeição se dê na ausência de nutrientes; (v) dita sujeição se dê na ausência de uma citocina; (vi) dita sujeição se dê na ausência de um ligante FLT-3; (vii) dita sujeição se dê na ausência do fator de células tronco (SCF); (viii)dita sujeição se dê na ausência

do fator estimulante de colônia de granulócitos (GCSF); (ix) dita sujeição se dê na ausência de uma citocina de ação incipiente; e (x) dita sujeição se dê na ausência de uma citocina de ação tardia.

5 2. "MÉTODO DE AUMENTAR O
POTENCIAL DE IMPLANTE E DE ATRAÇÃO CELULAR", de acordo com
a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que dita
população de células é derivada de uma fonte selecionada a
partir de um grupo consistindo de células
10 hematopoiéticas, células sanguíneas do cordão
umbilical, células sanguíneas periféricas
mobilizadas, células da medula óssea.

15 3. "MÉTODO DE AUMENTAR O
POTENCIAL DE IMPLANTE E DE ATRAÇÃO CELULAR", de acordo com
a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita
população de células é derivada de uma fração de célula
mononuclear.

20 4. "MÉTODO DE AUMENTAR O
POTENCIAL DE IMPLANTE E DE ATRAÇÃO CELULAR", de acordo com
a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender
ainda, o passo de se selecionar uma população de células
enriquecida de células tronco hematopoiéticas antes de,
concomitante com, ou em seguida ao dito passo ex-vivo de
sujeição.

25 5. "MÉTODO DE AUMENTAR O
POTENCIAL DE IMPLANTE E DE ATRAÇÃO CELULAR", de acordo a
reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito
período de tempo está entre 12 e 30 horas.

6. "MÉTODO DE AUMENTAR O POTENCIAL DE IMPLANTE E DE ATRAÇÃO CELULAR", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as ditas condições insuficientes para a expansão das células tronco 5 são determinadas a partir do grupo consistindo da ausência de nutrientes, ausência de citocinas de ação tardia e ausência de citocinas de ação incipiente.

7. "MÉTODO DE AUMENTAR O POTENCIAL DE IMPLANTE E DE ATRAÇÃO CELULAR", de acordo com 10 a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito período de tempo é suficiente para diminuir a expressão de CD26 nas células, mas insuficiente para a proliferação celular.

8. "MÉTODO DE AUMENTAR O 15 POTENCIAL DE IMPLANTE E DE ATRAÇÃO CELULAR", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a concentração de dita nicotinamida é 0,01 - 60 mg/ml.

9. "MÉTODO DE AUMENTAR O 20 POTENCIAL DE IMPLANTE E DE ATRAÇÃO CELULAR", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita quantidade efetiva de nicotinamida é 10 - 20mg/kg de peso corpóreo.

10. "MÉTODO DE AUMENTAR O 25 POTENCIAL DE IMPLANTE E DE ATRAÇÃO CELULAR", de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que ditas células sejam células cultivadas.

11. "MÉTODO DE PREPARAR CÉLULAS PARA TRANSPLANTE EM UM SUJEITO", compreendendo, o

método, em: (a) se sujeitar, ex vivo, uma população de células compreendendo as células em uma quantidade de nicotinamida por um período de tempo suficiente para aumentar homing e implante de tais células; o método 5 caracterizado, ademais, por ao menos um dos seguintes: (i) onde a dita população de células seja uma população de células tronco hematopoiéticas e/ ou uma população de células progenitoras e que o dito período de tempo seja determinado como insuficiente para expansão das células 10 tronco, ou que esteja sob condições insuficientes para a expansão de células tronco e/ ou de células progenitoras; (ii) onde a dita quantidade de nicotinamida e o dito período de tempo sejam determinados como suficientes para diminuir a expressão de CD26 pelas células da dita população celular, 15 porém não o suficiente para expansão de células tronco e/ ou progenitoras; (iii) dita população de células não inclui células hematopoiéticas, células tronco hematopoiéticas, células mononucleares, células progenitoras do fígado fetal, células progenitoras comprometidas, células progenitoras e 20 tronco não hematopoiéticas, ou células progenitoras e tronco embriônicas; (iv) dita sujeição se dê na ausência de nutrientes; (v) dita sujeição se dê na ausência de uma citocina; (vi) dita sujeição se dê na ausência de um ligante 25 FLT-3; (vii) dita sujeição se dê na ausência do fator de células tronco (SCF); (viii) dita sujeição se dê na ausência do fator estimulante de colônia de granulócitos (GCSF); (ix) dita sujeição se dê na ausência de uma citocina de ação incipiente; e (x) dita sujeição se dê na ausência de uma

citocina de ação tardia; e, subsequentemente b) se isolar as células.

12. "MÉTODO DE PREPARAR CÉLULAS PARA TRANSPLANTE EM UM SUJEITO", de acordo com a 5 reivindicação 11, caracterizado por compreender, além, o passo de se selecionar a população de células enriquecida de células tronco hematopoiéticas antes de, concomitante com, ou em seguida ao dito passo de sujeição ex-vivo.

10 13. "MÉTODO DE PREPARAR CÉLULAS PARA TRANSPLANTE EM UM SUJEITO", de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o dito período de tempo está em 12 e 30 horas.

15 14. "POPULAÇÃO DE CÉLULAS", compreendendo as células caracterizadas pelo potencial aumentado de implante e homing de acordo com os métodos de quaisquer itens da reivindicação 1.

20 15. "COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA", caracterizada por compreender, como princípio ativo, a população de células da reivindicação 14 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

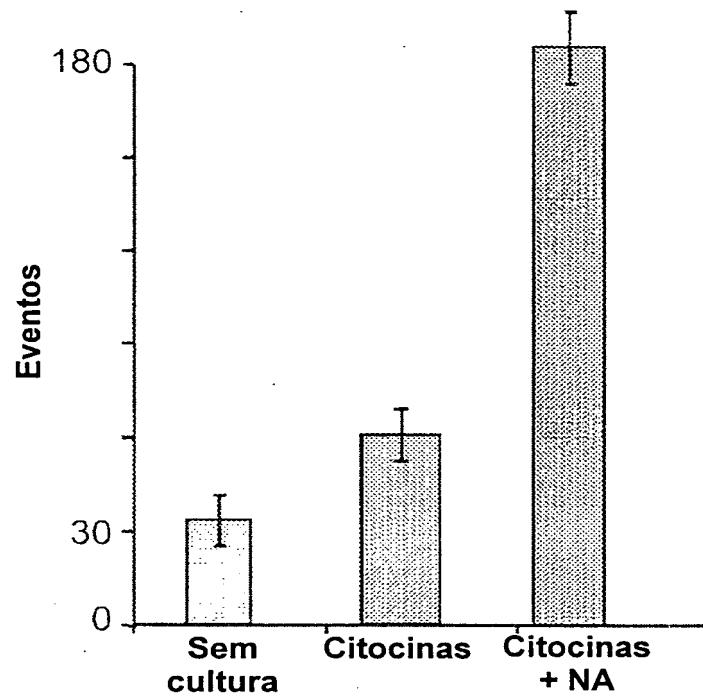


FIG.1A

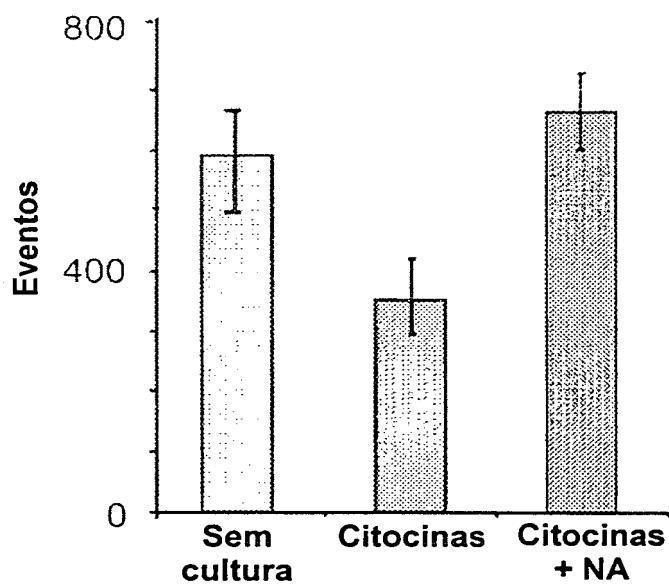


FIG.1B

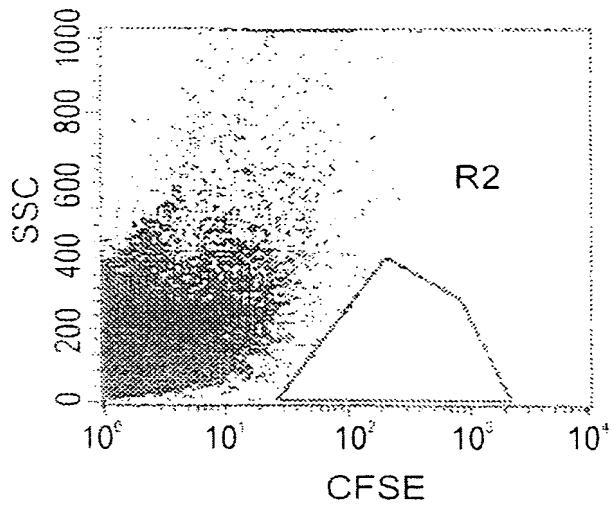


FIG.1C

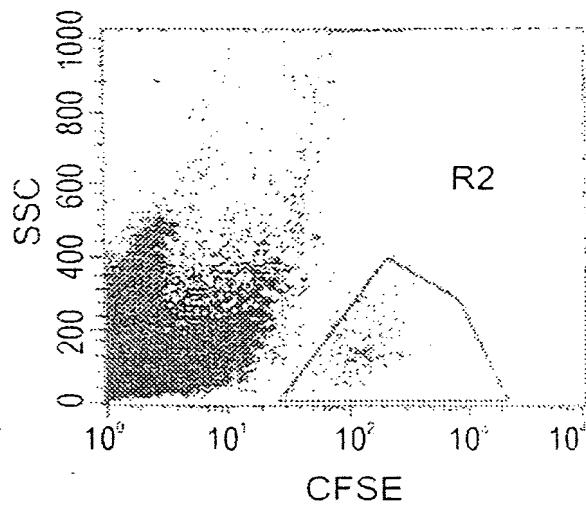


FIG.1D

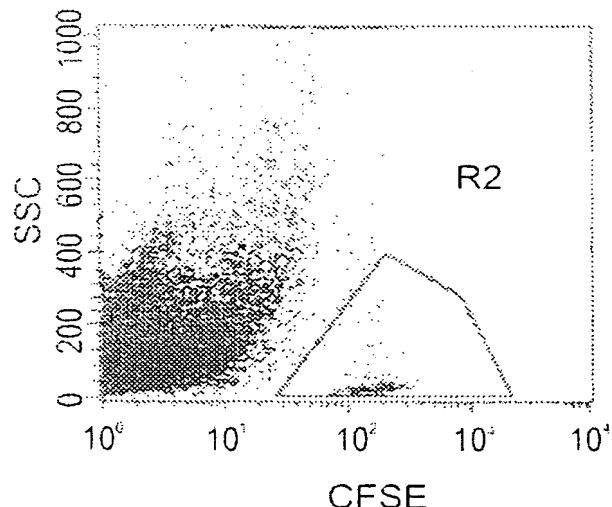


FIG.1E

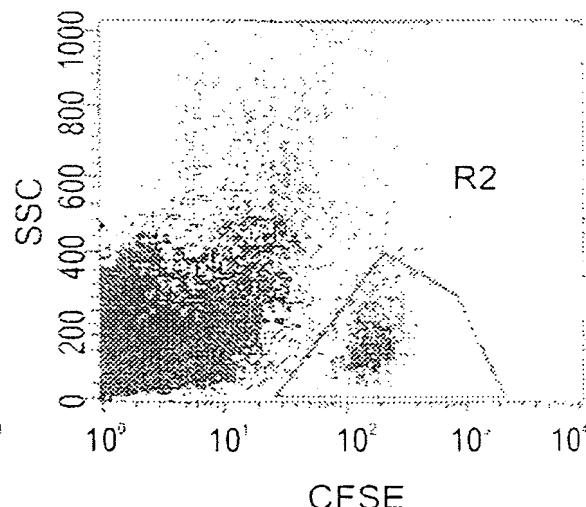


FIG.1F

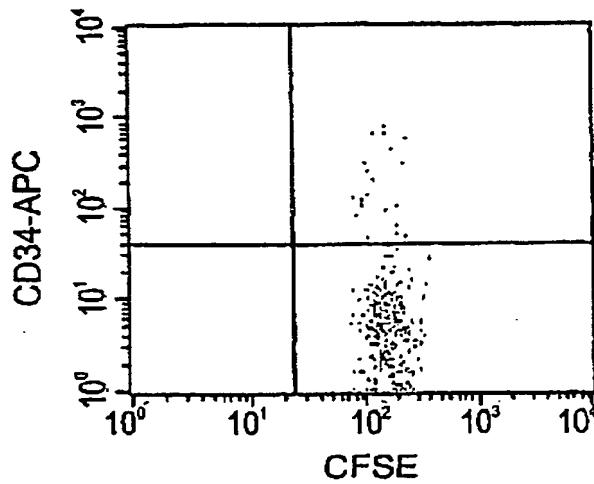


FIG.1G

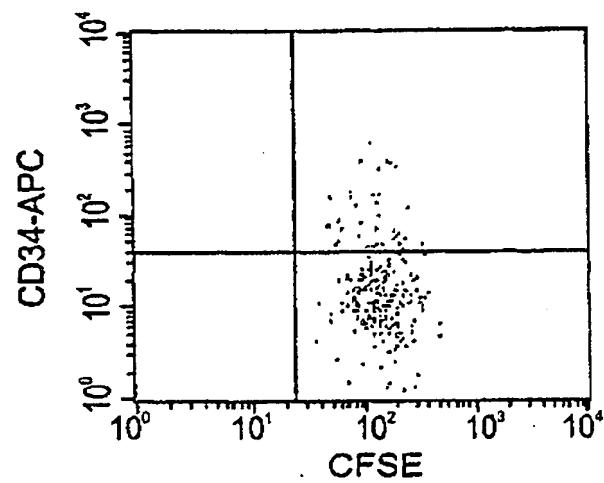


FIG.1H

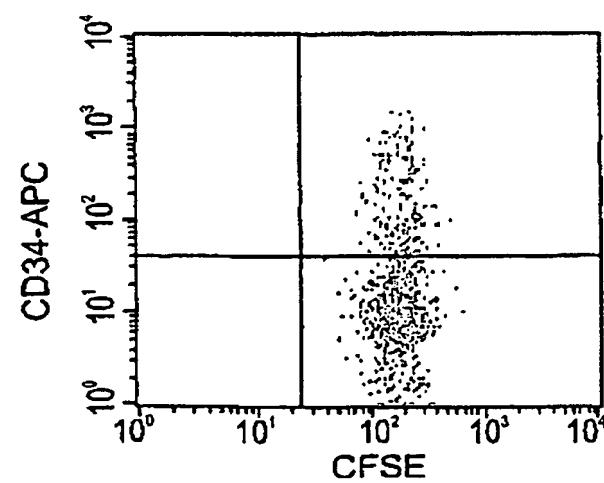


FIG.1I

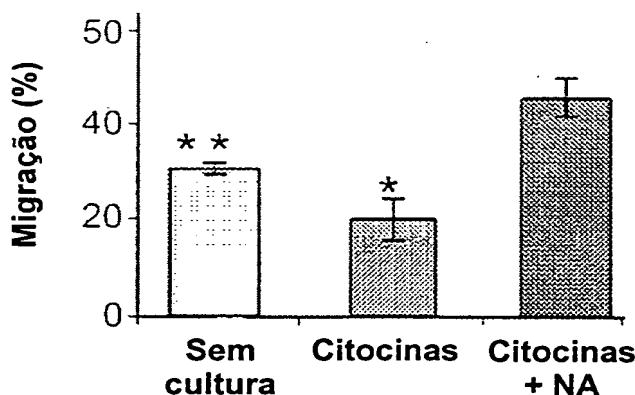


FIG.2

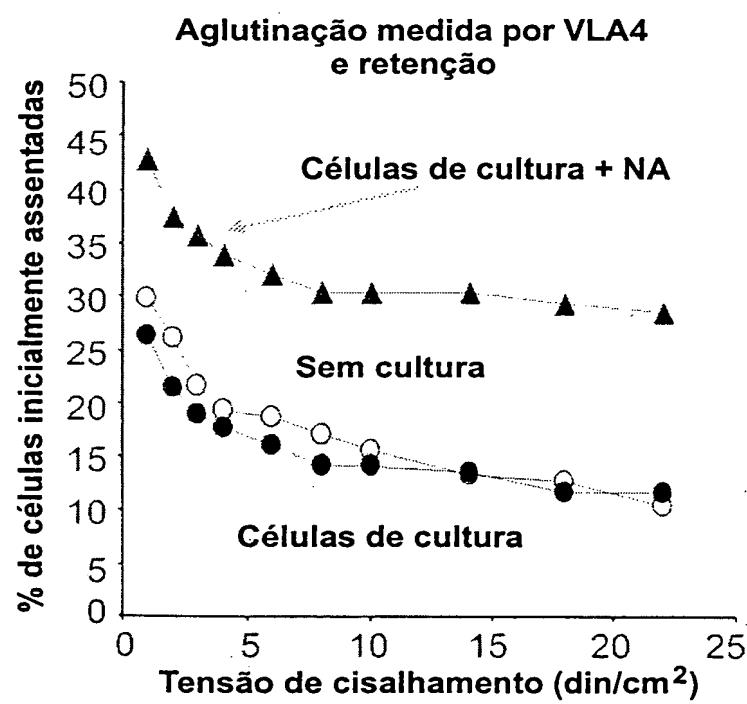


FIG.3

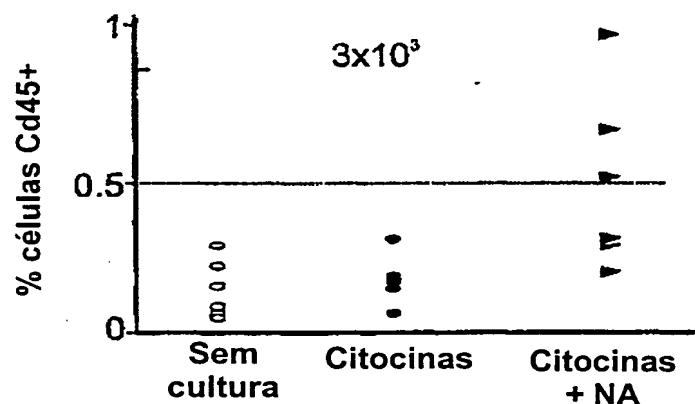


FIG.4A

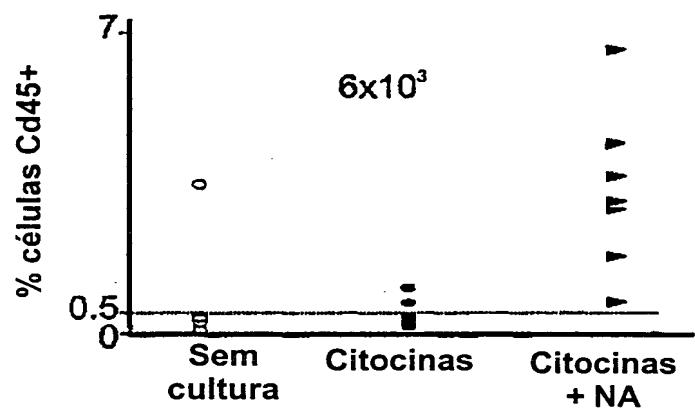


FIG.4B

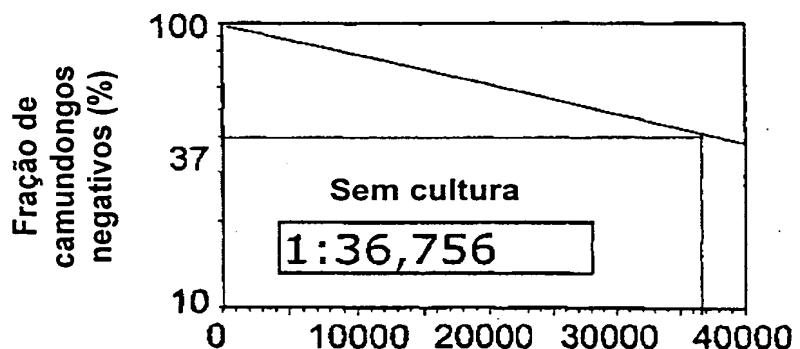


FIG.4C

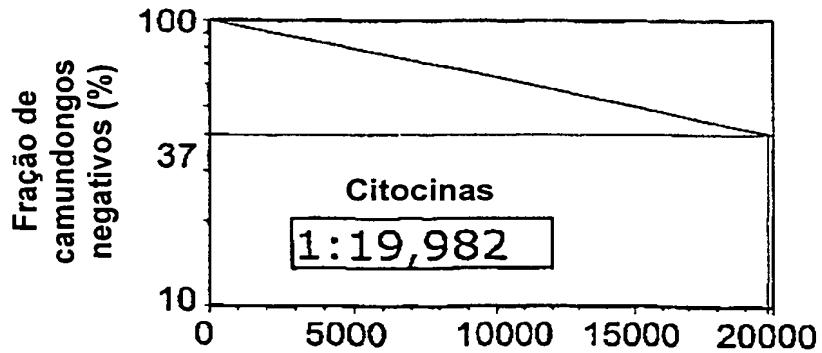


FIG.4D

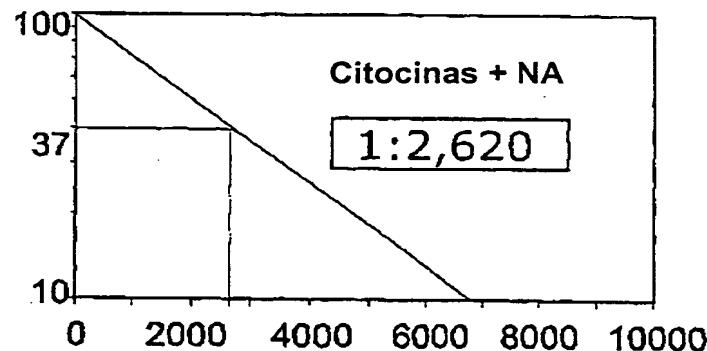


FIG.4E

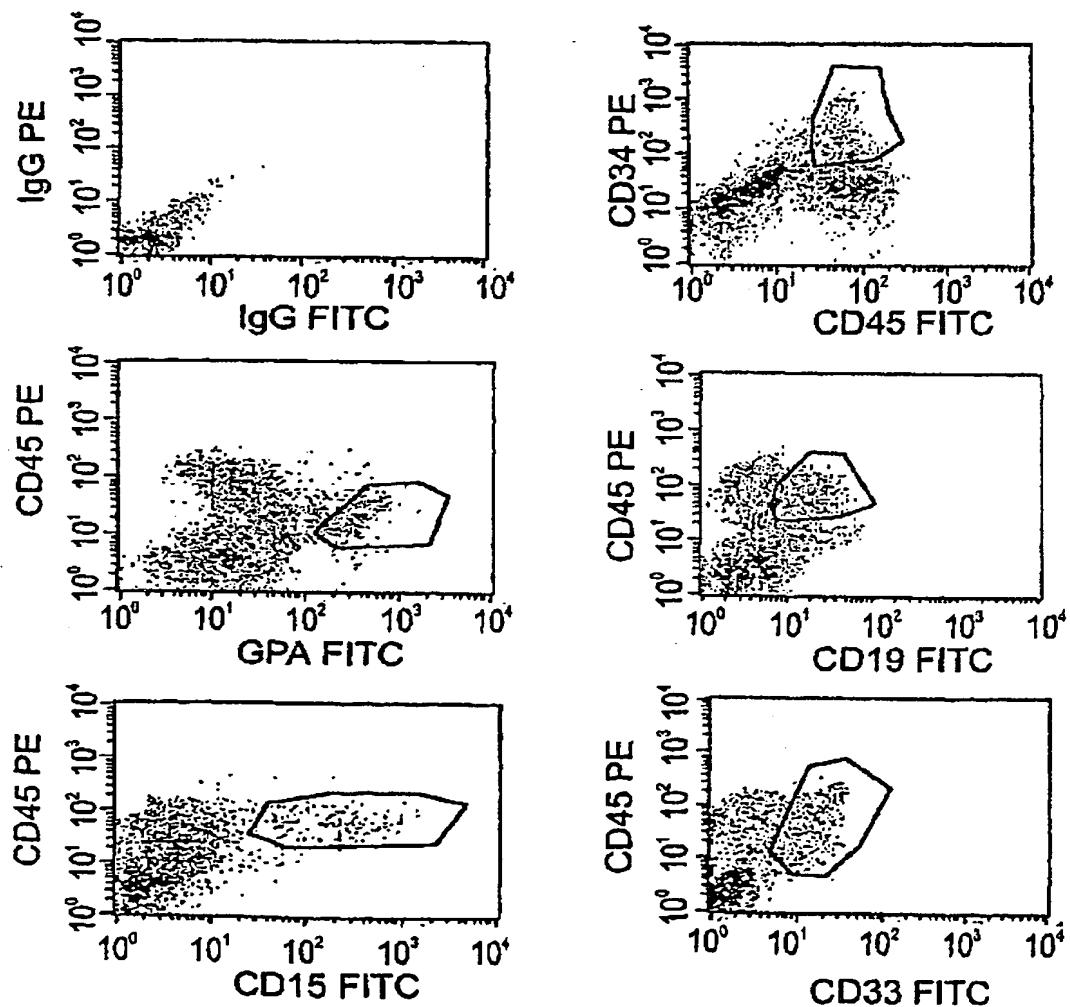


FIG.4F

Células transplantadas (Equivalente de saída)	Ratos enxertados	
	Citocinas	Citocinas + NA
5.0×10^4	3/4	4/4
2.5×10^4	1/4	4/4
1.25×10^4	2/5	5/5

FIG.5A

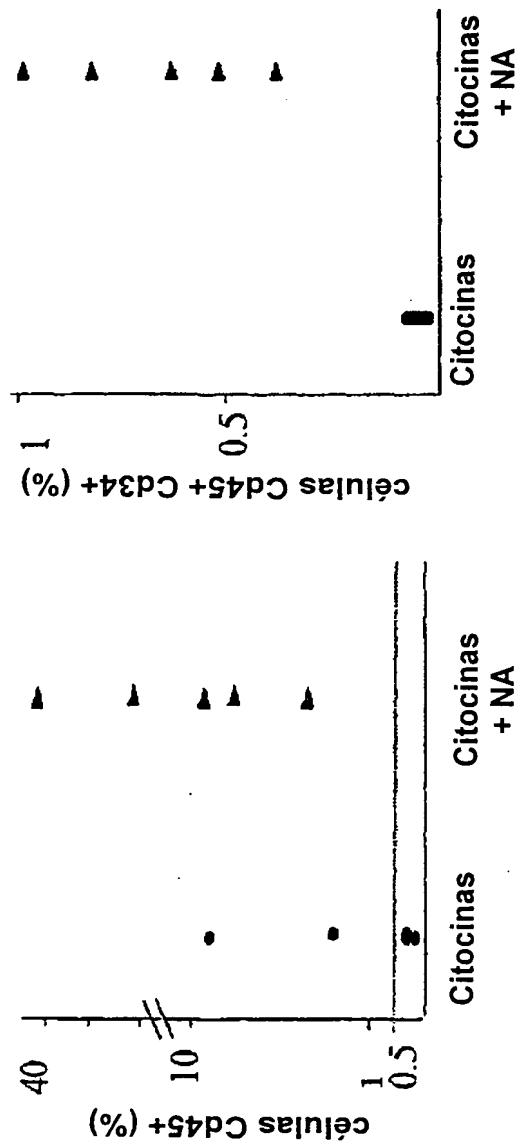


FIG.5B

FIG.5C

PI 06Z0523-2

RESUMO

"MÉTODO DE AUMENTAR O POTENCIAL DE IMPLANTE E DE ATRAÇÃO CELULAR, MÉTODO DE PREPARAR CÉLULAS PARA TRANSPLANTE EM UM SUJEITO, POPULAÇÃO DE CÉLULAS E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA", é previsto um método para aumentar o potencial de enxerto de célula; o método compreendendo sujeitar ex-vivo ou in-vitro uma população de células a uma quantidade de nicotinamida por um período de tempo suficiente para afetar a população de células, aumentando desse modo o potencial de enxerto da célula.