

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

(21) **PI0706373-3 A2**

(22) Data de Depósito: 11/01/2007
(43) Data da Publicação: 22/03/2011
(RPI 2098)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 35/12

(54) Título: **USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS E DISTÚRBIOS GENÉTICOS**

(30) Prioridade Unionista: 12/01/2006 US 60/758,387

(73) Titular(es): Osiris Therapeutics, Inc.

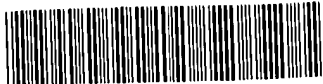
(72) Inventor(es): Alla Danilkovitch, Charles Randal Mills, Timothy Varney

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007000794 de 11/01/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/084354 de 26/07/2007

(57) Resumo: USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS E DISTÚRBIOS GENÉTICOS. A presente invenção refere-se a um método de tratamento de uma doença ou um distúrbio genético como, por exemplo, fibrose cística, doença de Wilson, esclerose lateral amiotrófica ou doença renal policística em um animal, que compreende a administração ao referido animal de células-tronco mesenquimais em uma quantidade eficaz para tratar a doença ou o distúrbio genético no animal.



PI0706373-3

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS E DISTÚRBIOS GENÉTICOS**".

Este pedido reivindica prioridade com base no pedido provisório número de série 60/758.387, depositado em 12 de janeiro de 2006, cujo conteúdo é incorporado por referência em sua totalidade.

A invenção está relacionada às células-tronco mesenquimais. Mais particularmente, esta invenção está relacionada ao uso de células-tronco mesenquimais para o tratamento de doenças e distúrbios genéticos. Ainda mais particularmente, esta invenção está relacionada ao uso de células-tronco mesenquimais para o tratamento de doenças ou distúrbios genéticos que são caracterizados por inflamação de pelo menos um tecido e/ou pelo menos um órgão.

Células-tronco mesenquimais (MSCs) são células-tronco multipotentes que podem se diferenciar facilmente em linhagens que incluem osteoblastos, miócitos, condrócitos e adipócitos (Pittenger et al., *Science*, Vol. 284, p. 143 (1999); Haynesworth et al., *Bone*, Vol. 13, p. 69 (1992); Prockop, *Science*, Vol. 276, p. 71 (1997)). Estudos *in vitro* demonstraram a capacidade de MSCs para se diferenciar em músculo (Wakitani et al., *Muscle Nerve*, Vol. 18, p. 1.417 (1995)), precursores tipo neuronais (Woodbury et al., *J. Neurosci. Res.*, Vol. 69, p. 908 (2002); Sanchez-Ramos et al., *Exp. Neurol.*, Vol. 171, p. 109 (2001)), cardiomiócitos (Toma et al., *Circulation*, Vol. 105, p. 93 (2002); Fakuda, *Artif. Organs*, Vol. 25, p. 187 (2001)) e possivelmente outros tipos de células. Além disso, foi demonstrado que as MSCs fornecem camadas de alimentação eficazes para expansão de células-tronco hematopoiéticas (Eaves et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, Vol. 938, p. 63 (2001); Wagers et al., *Gene Therapy*, Vol. 9, p. 606 (2002)). Estudos recentes com diversos modelos animais demonstraram que as MSCs podem ser úteis no reparo ou regeneração de tecidos ósseos, cartilagosos, de menisco ou miocárdico danificados (DeKok et al., *Clin. Oral Implants Res.*, Vol. 14, p. 481 (2003)); Wu et al., *Transplantation*, Vol. 75, p. 679 (2003); Noel et al., *Curr. Opin. Investig. Drugs*, Vol. 3, p. 1.000 (2002); Belles et al., *J. Cell. Biochem. Suppl.*,

Vol. 38, p. 20 (2002); Mackenzie et al., *Blood Cells Mol. Dis.*, Vol. 27 (2002)).
Vários investigadores utilizaram MSCs com resultados encorajadores para
transplante em modelos animais de doença que incluem osteogênese imper-
feita (Pereira et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Vol. 95, p. 1.142 (1998)), mal de
5 Parkinson (Schwartz et al., *Hum. Gene Ther.*, Vol. 10, p. 2.539 (1999)), lesão
da medula espinhal (Chopp et al., *Neuroreport*, Vol. 11, p. 3.001 (2000); Wu
et al., *J. Neurosci. Res.*, Vol. 72, p. 393 (2003)) e distúrbios cardíacos (Tomi-
ta et al., *Circulation*, Vol. 100, p. 247 (1999); Shake et al., *Ann. Thorac. Surg.*
Vol. 73, p. 1.919 (2002)). Significativamente, também foram relatados resul-
10 tados promissores em experimentos clínicos para osteogênese imperfeita
(Horwitz et al., *Blood*, Vol. 97, p. 1.227 (2001); Horowitz et al. *Proc. Nat. A-
cad. Sci.*, Vol. 99, p. 8.932 (2002)) e enxerto aperfeiçoado de transplantes
heterólogos de medula óssea (Frassoni et al., *Int. Society for Cell Therapy*,
SA006 (resumo) (2002); Koc et al., *J. Clin. Oncol.*, Vol. 18, p. 307 (2000)).

15 As requerentes descobriram que células-tronco mesenquimais,
quando administradas sistemicamente como, por exemplo, por administra-
ção intravenosa ou intra-óssea, migram em direção e se enxertam dentro do
tecido inflamado. Dessa forma, de acordo com um aspecto da presente in-
venção, é fornecido um método de tratamento de uma doença ou um distúr-
20 bio genético em um animal e, mais particularmente, um método de tratamen-
to de uma doença ou um distúrbio genético caracterizado por pelo menos
um tecido ou órgão inflamado do animal. O método compreende a adminis-
tração ao animal de células-tronco mesenquimais em uma quantidade eficaz
para tratar a doença ou o distúrbio genético no animal.

25 Embora o escopo da presente invenção não se limite a qualquer
consideração teórica, células-tronco mesenquimais (MSCs) infundidas se
dirigem, ou seja, migram em direção e se enxertam, dentro do tecido infla-
mado. Foi descrito um envolvimento inflamatório para várias doenças gêné-
ticas que incluem, sem limitação, doença renal policística, fibrose cística,
30 doença de Wilson, doença de Gaucher e doença de Huntington, por exem-
plo. A presença de inflamação dentro do tecido ou órgãos afetado por esses
e por outros distúrbios genéticos podem facilitar o direcionamento das MSCs

aos tecidos e/ou órgãos inflamados, e facilita o enxerto das MSCs.

A administração das MSCs pode corrigir disfunção tecidual e/ou orgânica causada por um defeito genético, na medida em que as MSCs carregam uma cópia do tipo selvagem do gene que está defeituoso no animal tratado. A administração das MSCs ao paciente resulta no enxerto de células que carregam o gene do tipo selvagem nos tecidos e/ou órgãos afetados pela doença. As MSCs enxertadas irão se diferenciar de acordo com o ambiente local. Mediante a diferenciação, as MSCs irão expressar a versão do tipo selvagem da proteína que está defeituosa ou ausente no tecido circun-

5
10

dante. O enxerto e a diferenciação das MSCs do doador dentro do tecido e/ou órgão defeituoso corrigirão a função do tecido e/ou órgão.

Além disso, a transdução genética das MSCs do doador não é necessária, na medida em que as MSCs do doador possuem uma versão do tipo selvagem endógena do mesmo gene que está defeituoso no animal tra-

15

tado. A correção da função do tecido e/ou órgão resulta da presença desse gene do tipo selvagem.

O uso de MSCs como veículo para a liberação do gene do tipo selvagem fornecerá cópias normais de todos os genes, os quais, quando mutados, levam ao desenvolvimento da doença genética a ser tratada. Isso é verdade: (1) caso o(s) defeito(s) do gene tenha sido identificado; (2) caso a contribuição da forma mutada do(s) gene(s) para o desenvolvimento da doença seja conhecida, e (3) caso a doença resulte de uma única mutação ge-

20

nética ou uma combinação de mutações genéticas. A expressão da forma normal das proteínas, as quais, quando não funcionais, contribuem para o desenvolvimento da doença, irá melhorar ou corrigir a função de tecidos da-

25

nificados pela doença.

Em geral, a doença ou o distúrbio genético a ser tratado é uma doença ou um distúrbio genético caracterizado por pelo menos um tecido ou órgão inflamado, embora outras doenças e distúrbios genéticos também possam ser tratados. Doenças ou distúrbios genéticos que podem ser trata-

30

dos de acordo com a presente invenção incluem, sem limitação, fibrose cística, doença renal policística, doença de Wilson, esclerose lateral amiotrófica

(ou ALS ou doença de Lou-Gehrig), distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, doença de Gaucher, mal de Parkinson, mal de Alzheimer, doença de Huntington, síndrome de Charcot-Marie-Tooth, síndrome de Zellweger, síndrome poliglandular auto-imune, síndrome de Marfan, síndrome de Werner, adrenoleucodistrofia (ou ALD), síndrome de Menkes, osteopetrose infantil maligna, ataxia espinocerebelar, atrofia muscular espinhal (ou SMA) e malabsorção de glicose galactose.

Por exemplo, a fibrose cística (CF) é um distúrbio genético caracterizado por funcionalidade alterada de células secretoras nos pulmões, pâncreas e outros órgãos. O defeito da secreção nessas células é causado pela ausência de uma cópia funcional do gene Regulador da Condutância Transmembrana da Fibrose Cística (CFTR). As mutações no gene CFTR resultam no surgimento de um muco pegajoso, anormalmente espesso, forçando os pulmões, que obstrui as passagens aéreas e leva a infecções potencialmente fatais. Além disso, as secreções espessas no pâncreas evitam que as enzimas digestivas alcancem os intestinos, levando a um ganho de peso deficiente.

A administração de MSC pode ser empregada para tratar os sintomas de CF pelo fornecimento de genes CFTR do tipo selvagem (normais) aos tecidos afetados pela doença. A localização de MSCs liberadas sistemicamente aos pulmões é efetuada tanto pela via do fluxo circulatório quanto pela resposta de migração de MSCs para os tecidos inflamados. Os pacientes com CF tipicamente sofrem de infecções frequentes dos pulmões por *Pseudomonas aeruginosa*. Ciclos sucessivos de infecção por *Pseudomonas* e resolução são acompanhados por inflamação e cicatrização. Os marcadores inflamatórios nos pulmões de pacientes com CF incluem TNF- α e MCP-1, quimiocinas conhecidas por promoverem recrutamento de MSC.

Após integração dentro dos tecidos afetados, as MSCs se diferenciam (amadurecem) de acordo com o ambiente local, e começam a produzir proteína CFTR funcionalmente normal. A presença de células que contêm uma forma ativa da proteína aumenta ou corrige o defeito secretor observado em tecidos de CF. A liberação de MSC também limita a progressão

de fibrose e a expansão da cicatriz nos pulmões de pacientes com CF.

A doença de Wilson é um distúrbio genético do transporte de cobre, causando acúmulo de cobre e toxicidade hepática, do cérebro, olhos e em outros locais. O fígado de uma pessoa que tem a doença de Wilson não libera cobre na bile corretamente. Um defeito no gene ATP7B é responsável pelos sintomas da doença de Wilson.

O acúmulo de cobre no fígado produz dano tecidual caracterizado por inflamação e fibrose. A resposta inflamatória da doença de Wilson envolve TNF- α , uma quimiocina conhecida por promover o recrutamento de MSCs para o tecido danificado. Por conseguinte, MSCs liberadas sistemicamente migram para regiões hepáticas inflamadas em pacientes com doença de Wilson. Mediante enxerto, as MSC se diferenciam para formar hepatócitos e iniciam a expressão da cópia normal do gene ATP7B e a produção de proteína ATP7B funcional.

Hepatócitos derivados de MSCs liberadas exogenamente, portanto, irão realizar o transporte normal de cobre reduzindo ou atenuando, dessa forma, o acúmulo de cobre em excesso no fígado. A maturação de MSCs com especificidade de localização também pode reduzir o acúmulo de cobre no cérebro e nos olhos. A redução do acúmulo de cobre nesses tecidos resolverá os sintomas da doença de Wilson em pacientes tratados por terapia com MSC.

A esclerose amiotrófica lateral (ALS ou doença de Lou Gehrig) é um distúrbio neurológico caracterizado por degeneração progressiva das células neuronais motoras na medula espinhal e no cérebro, o que ao final leva à paralisia e morte. O gene SOD1 (ou gene ALS1) está associado a muitos casos de ALS familiar (*Nature*, Vol. 362: 59-62). A enzima codificada pelo SOD1 remove radicais superóxido ao convertê-los em substâncias inofensivas. Os defeitos na ação de SOD1 causam morte celular em função dos níveis excessivos de radicais superóxido. Várias mutações diferentes nessa enzima resultam em ALS, o que torna difícil a determinação da causa molecular exata da doença. Outros genes conhecidos que, quando mutados, contribuem para o surgimento de ALS incluem ALS2 (*Nature Genetics*, 29(2):

166-73.), ALS3 (*Am. J. Hum. Genet.*, janeiro de 2002 70(1): 251-6) e ALS4 (*Am. J. Hum. Genet.* junho; 74(6)).

Suspeita-se que haja vários genes atualmente não identificados que contribuem para a suscetibilidade à ALS. Isso ocorre particularmente em
5 pacientes com ALS não familiar. O tratamento com MSC fornece cópias normais desses genes aos pacientes com ALS, pois as MSCs do doador são obtidas de doadores saudáveis, e as mutações que levam ao desenvolvimento de ALS são raras.

O uso de MSCs como veículo para a liberação de gene do tipo
10 selvagem fornecerá cópias normais de todos os genes, os quais, quando mutados, levam ao desenvolvimento da ALS. Isso ocorre: (1) se o(s) defeito(s) do gene tiver(em) sido identificado(s), (2) se a contribuição da forma mutada do(s) gene(s) para o desenvolvimento de ALS for conhecida, e (3) se a doença for causada de uma única mutação genética ou uma combinação
15 de mutações genéticas. A expressão da forma normal das proteínas que, quando não funcionais, contribuem para o desenvolvimento da ALS, irá restaurar a função muscular em pacientes com ALS.

Distrofias musculares são doenças que envolvem a destruição progressiva dos músculos voluntários, afetando eventualmente os músculos
20 que controlam a função pulmonar. As distrofias musculares de Duchenne e Becker são causadas por mutações no gene que codifica a proteína distrofina. Na distrofia muscular de Duchenne, a doença mais severa, a proteína distrofina normal está ausente. Na distrofia muscular de Becker, mais leve, é feita alguma distrofina normal, mas em quantidades insuficientes.

25 A Distrofina transmite integridade estrutural às células musculares ao conectar o citoesqueleto à membrana plasmática. As células musculares que não possuem ou que possuem quantidades insuficientes de distrofina também são relativamente permeáveis. Componentes extracelulares podem penetrar nessas células mais permeáveis, aumentando a pressão
30 interna até que a célula muscular se rompa e morra. A resposta inflamatória subsequente pode se somar ao dano. Os mediadores inflamatórios na distrofia muscular incluem TNF- α (*Acta Neuropathol. (Berl.)*, fevereiro de 2005;

109(2): 217-25. Epub 16 de novembro de 2004), uma quimiocina conhecida por promover migração de MSCs para o tecido danificado.

A liberação de MSCs contendo um gene normal de distrofina trata os sintomas da distrofia muscular de Duchenne e de Becker da seguinte forma: a migração de MSCs para o músculo degenerativo irá resultar na diferenciação de MSCs de acordo com o ambiente local, nesse caso, para formar células musculares. As MSCs que se diferenciam para formar músculo expressarão a proteína distrofina normal, pois essas células carregam o gene normal de distrofina. As células musculares derivadas de MSCs irão se fundir com células musculares endógenas, fornecendo a proteína distrofina normal para a célula multinucleada. A fusão bem-sucedida de MSCs que expressam distrofina com mioblastos humanos em diferenciação foi relatada em um artigo intitulado, "Human mesenchymal stem-cells ectopically expressing full-length dystrophin can complement Duchenne muscular dystrophy myotubes by cell fusion" (Gonçalves et al., *Advance Access* publicado *online* em 1º de dezembro de 2005 em "Human Molecular Genetics"). Quanto maior o grau de enxerto de MSCs dentro do músculo degenerativo, mais parecido o tecido muscular será com o músculo normal, estrutural e funcionalmente.

A doença de Gaucher é causada pela incapacidade de produção da enzima glucocerebrosidase, uma proteína que normalmente degrada um tipo particular de gordura chamada glucocerebrosídeo. Na doença de Gaucher, glucocerebrosídeo se acumula no fígado, baço e medula óssea.

A doença de Gaucher pode ser tratada pela liberação de MSCs que possuem uma cópia normal do gene que codifica a glucocerebrosidase. O dano tecidual causado pelo acúmulo de glucocerebrosídeo produz uma resposta inflamatória que causa a migração de MSCs para as regiões danificadas. A resposta inflamatória na doença de Gaucher envolve TNF- α , uma citocina conhecida por recrutar MSCs para áreas de dano tecidual (*Eur. Cytokine Netw.*, junho de 1999; 10(2): 205-10). Após serem enxertadas dentro do tecido danificado, as MSCs irão se diferenciar para substituir tipos celulares ausentes de acordo com as indicações ambientais locais. As células de-

rivadas de MSCs terão a capacidade de degradar glucocerebrosideo normalmente, em função da expressão da capacidade para expressar glucocerebrosidase ativa por essas células.

5 A enzima glucocerebrosidase liberada por via intravenosa é eficaz para retardar a progressão, ou até mesmo reverter, os sintomas da doença de Gaucher (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28 de maio de 2004; 318(2): 381-90). Não se sabe se MSCs do tipo selvagem irão produzir glucocerebrosidase que será disponível externamente para as células derivadas de MSCs que produzem a enzima. Caso isso ocorra, a expressão de glucocerebrosidase por MSCs derivadas exogenamente reduzirá os níveis de glucocerebrosideo no tecido circundante. Nesse caso, os benefícios da terapia com MSCs para a doença de Gaucher se baseariam não apenas na contribuição das células que possuem a capacidade de degradar a glucocerebrosideo, mas também no fato de que essas células também podem fornecer
10 glucocerebrosidase às células vizinhas, resultando na redução de glucocerebrosideo no tecido nativo.
15

O mal de Parkinson (PD) é um distúrbio do sistema motor decorrente da perda de células cerebrais produtoras de dopamina. Os sintomas primários da PD são tremor, rigidez dos membros e do tronco, bradicinesia e
20 alterações do equilíbrio e da coordenação. Uma característica patológica clássica da doença é a presença de um corpo de inclusão, denominado corpo de Lewy, em muitas regiões do cérebro.

Acredita-se geralmente que haja um componente genético na PD, e que diversas mutações distintas podem causar o surgimento da doença. Um gene que supostamente está envolvido em pelo menos alguns casos
25 de mal de Parkinson é o ASYN, que codifica a proteína alfa-sinucleína. O acúmulo de alfa-sinucleína em placas de corpo de Lewy é uma característica tanto do mal de Parkinson quanto do mal de Alzheimer.

Ainda não está claro se o acúmulo de alfa-sinucleína é a causa
30 básica do dano neural no mal de Parkinson ou consequência da morte da célula neural. Caso o acúmulo de alfa-sinucleína seja a causa primária da degeneração neural, então uma possibilidade é que uma ou mais proteínas

adicionais responsáveis pela regulação da expressão ou acúmulo de alfa-sinucleína declinem com a idade. Portanto, acredita-se que um mecanismo pelo qual a terapia com MSC poderia tratar a PD seja o fornecimento de uma fonte renovada de uma ou mais dessas proteínas reguladoras.

5 Independentemente da base genética da doença, a liberação de MSCs aos pacientes com PD resulta na substituição de células produtoras de dopamina. A inflamação resultante da morte da célula neuronal deve induzir a migração de MSCs diretamente para as regiões afetadas do cérebro.

10 O mal de Alzheimer produz uma perda progressiva da capacidade de se lembrar de fatos e eventos e, eventualmente, reconhecer amigos e familiares. A patologia dos cérebros de pacientes com Alzheimer é caracterizada pela formação de lesões feitas por células cerebrais fragmentadas circundadas por proteínas da família amilóide.

15 A liberação de MSCs que contêm cópias normais dos genes de presenilina-1 (PS1), presenilina-2 (PS2) e possivelmente outros genes ainda não identificados irá tratar as complicações do mal de Alzheimer. A inflamação resultante da fragmentação de células cerebrais características da doença atrai a migração de MSCs para a área. As MSCs podem se diferenciar em tipos de células neurais quando situadas dentro do tecido neural danificado.

20 Além disso, as metaloproteinases expressas e secretadas pelas MSCs reduzem as lesões características encontradas nos cérebros de pacientes com Alzheimer por degradação das proteínas amilóides e de outros tipos de proteínas dentro dessas placas. A resolução de placas amilóides irá proporcionar uma oportunidade para a diferenciação de MSCs e células-tronco en-

25 dógenas para a formação de neurônios.

 A doença de Huntington (HD) é uma doença neurológica degenerativa hereditária, que leva à diminuição do controle de movimentos, perda das faculdades intelectuais e distúrbios emocionais. Uma mutação no gene HD, o gene que codifica a proteína de Huntington, eventualmente produz

30 degeneração nervosa nos gânglios da basal e do córtex cerebral do cérebro.

 Ainda não está claro como as mutações no gene HD causam a doença de Huntington. A inflamação associada à degeneração neural, no

entanto, proporciona um ambiente que induz o recrutamento de MSCs. O enxerto de MSCs nessas regiões irá levar à diferenciação de acordo com o ambiente local, incluindo maturação de MSCs para formar neurônios que carregam a forma normal do gene HD. Um efeito da terapia com MSCs, portanto, é a substituição de neurônios perdidos pela degeneração neural.

Fatores que contribuem para o surgimento e/ou a progressão da doença de Huntington podem incluir uma diminuição associada à idade das proteínas reguladoras que controlam o nível de produção da proteína de Huntington. Dessa forma, a administração de MSCs restaura a disponibilidade desses constituintes reguladores.

A síndrome de Charcot-Marie-Tooth (CMT) é caracterizada por uma degeneração progressiva lenta dos músculos dos pés, a perna inferior, mãos e antebraços e uma ligeira perda de sensibilidade nos membros, e nos dedos das mãos e dos pés.

Os genes que produzem a CMT quando mutados são expressos em células de Schwann e neurônios. Várias mutações diferentes e distintas, ou combinações de mutações, podem produzir os sintomas da CMT. Também são conhecidos diferentes padrões de hereditariedade das mutações da CMT. Uma das formas mais comuns da CMT é o Tipo 1A. Acredita-se que o gene que está mutado na CMT do Tipo 1A codifique a proteína PMP22, que está envolvido no revestimento dos nervos periféricos com mielina, uma bainha gordurosa importante na condução nervosa. Outros tipos de CMT incluem o Tipo 1B, o tipo auto-sômico-recessivo e ligado ao X.

A liberação de MSCs que expressam uma cópia normal do gene da CMT do Tipo 1A, do gene da CMT do Tipo 1B e/ou de outros genes pode restaurar o revestimento de mielina dos nervos periféricos. Um componente da resposta inflamatória em regiões degenerativas envolve a produção e secreção de MCP-1 (proteína J quimioatrativa de monócitos. *Neurosci Res.*, 15 de setembro de 2005; 81(6): 857-64), uma citocina conhecida por apoiar a estadia das MSCs no tecido danificado. O mecanismo de restauração da estrutura e da funcionalidade do tecido degenerativo dependerá da mutação específica envolvida na promoção da doença.

Outras doenças genéticas que podem ser tratadas pela administração de MSCs são listadas abaixo.

Doença renal policística: a liberação de uma forma normal do gene PKD1 pode inibir a formação de cistos.

5 Síndrome de Zellweger: a liberação de uma cópia normal do gene PXR1 pelas MSCs corrige a função do peroxissomo, normalizando o metabolismo celular lipídico e a oxidação metabólica.

10 Síndrome poliglandular auto-imune: a doença será tratada pela liberação de MSCs que expressam uma cópia normal do gene AIRE (regulador auto-imune) e/ou regeneração do tecido glandular destruído durante a progressão da doença.

15 Síndrome de Marfan: a liberação de MSCs que expressam uma forma normal do gene FBN1 causará a produção da proteína fibrilina. A presença de fibrilina irá restaurar a integridade estrutural normal aos tecidos conjuntivos.

Síndrome de Werner: a liberação de MSCs que expressam forma normal do gene WRN fornece uma fonte de células para renovação de tecidos que não envelhecem prematuramente.

20 Adrenoleucodistrofia (ALD): a liberação de MSCs que expressam uma forma normal do gene ALD resulta na mielinização normal dos neurônios no cérebro e/ou causará a regeneração de áreas danificadas da glândula adrenal.

25 Síndrome de Menkes: a liberação de MSCs que expressam uma cópia normal de um gene ainda não identificado ou de genes no cromossomo X que possuem a capacidade de absorver cobre irá resolver os sintomas da doença.

30 Osteopetrose infantil maligna: MSCs que carregam cópias normais de genes que, quando mutados, contribuem para o surgimento de osteopetrose infantil maligna. Esses genes incluem o gene do canal de cloreto 7 (CLCN7), o gene da proteína transmembrana associada à osteopetrose (OSTM1) e o gene regulador imune de células T (TCIRG1). A liberação de MSCs pode corrigir a proporção de osteoblastos/osteoclastos pelo forneci-

mento de MSCs que podem atuar como precursores de osteoblastos e/ou precursores para outros tipos de células que controlam a diferenciação de osteoclastos.

5 Ataxia espinocerebelar: a liberação de MSCs que expressam uma forma normal do gene SCA1 fornece células que irão se diferenciar para formar novos neurônios que produzem a proteína ataxina-1 (o produto do gene SCA1) em níveis apropriados para substituir os neurônios do hospedeiro perdidos pela degeneração neural. Também é possível que o enxerto de MSCs forneça proteínas que regulam a expressão da proteína ataxina-1.

10 Atrofia muscular espinhal: a liberação de MSCs que expressam uma cópia normal do gene SMA fornecerá células que se diferenciarão para formar novos neurônios motores para substituir os neurônios que morreram durante a progressão da doença.

15 Má-absorção de glicose e galactose: a liberação de MSCs que expressam cópias normais do gene SGLT1 irá corrigir o transporte de glicose e galactose através do revestimento intestinal.

Deve-se entender, no entanto, que o escopo da presente invenção não se limita ao tratamento de qualquer doença ou distúrbio genético em particular.

20 Em uma modalidade, o animal que recebe a administração das células-tronco mesenquimais é um mamífero. O mamífero pode ser um primata, incluindo primatas humanos e não humanos.

25 Em geral, a terapia com células-tronco mesenquimais (MSCs) se baseia, por exemplo, na seguinte seqüência: coleta de tecido que contém MSCs, isolamento e expansão de MSCs e administração das MSCs ao animal, com ou sem manipulação bioquímica.

30 As células-tronco mesenquimais que são administradas podem ser uma composição homogênea ou podem ser uma população mista de células enriquecida em MSCs. Composições homogêneas de células-tronco mesenquimal podem ser obtidas pelo cultivo de células da medula ou periosteas aderentes, e as células-tronco mesenquimais podem ser identificadas por marcadores específicos da superfície celular que são identificados com

anticorpos monoclonais únicos. Um método para a obtenção de uma população de células enriquecida em células-tronco mesenquimais é descrito, por exemplo, na Patente U.S. Nº 5.486.359. Fontes alternativas para células-tronco mesenquimais incluem, sem limitação, sangue, pele, sangue do cordão umbilical, músculo, gordura, osso e pericôndrio.

As células-tronco mesenquimais podem ser administradas por vários procedimentos. Por exemplo, as células-tronco mesenquimais podem ser administradas sistemicamente, por exemplo, por administração intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal ou intra-óssea. As MSCs também podem ser liberadas por injeção direta aos tecidos e órgãos afetados pela doença. Em uma modalidade, as células-tronco mesenquimais são administradas por via intravenosa. Em outra modalidade, as células-tronco mesenquimais são administradas por via intra-óssea.

As células-tronco mesenquimais podem ser de diversas fontes, incluindo fontes alogênicas, autólogas e xenogênicas.

Em uma modalidade, antes da administração das células-tronco mesenquimais do doador, a população de células-tronco mesenquimais do hospedeiro é reduzida, o que aumenta a persistência das MSCs do doador. A redução da população de células-tronco mesenquimais do hospedeiro pode ser diminuída por qualquer de diversos meios conhecidos por aqueles versados na técnica, incluindo, sem limitação, irradiação parcial ou total do corpo e/ou procedimentos quimioablativos ou não ablativos.

Em uma modalidade não limitante, o hospedeiro é submetido à irradiação parcial ou total do corpo antes da administração das MSCs do doador. A radiação pode ser administrada como dose única ou em doses múltiplas. Em uma modalidade, a radiação é administrada em uma quantidade total de cerca de 8 Grays (Gy) a cerca de 12 Grays (Gy). Em outra modalidade, a radiação é administrada em uma quantidade total de cerca de 10 Gy a cerca de 12 Gy. A quantidade de radiação a ser administrada e o número de doses administradas dependem de diversos fatores, incluindo a idade, o peso e sexo do paciente, e da saúde geral do paciente no momento da administração.

Em uma modalidade não limitante, quando a população de MSCs do hospedeiro for reduzida através da irradiação parcial ou total do corpo e/ou de procedimentos quimioablativos ou não ablativos, serão administradas células da medula óssea junto com as MSCs a fim de reconstruir o sistema hematopoiético do hospedeiro. As células da medula óssea podem ser administradas sistemicamente por métodos como, por exemplo, administração intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal ou intra-óssea. A quantidade de células da medula óssea a ser administrada depende de diversos fatores, incluindo a idade, o peso e sexo do paciente, o tratamento com radiação e/ou quimioablativo ou não ablativo dado ao paciente, a saúde geral do paciente, e a fonte da medula óssea.

Em uma modalidade, as células da medula óssea são autólogas para o paciente. Em uma modalidade adicional, as células autólogas da medula óssea são administradas em uma quantidade de 1×10^7 células a cerca de 1×10^8 células por kg de peso corporal.

Em outra modalidade, as células da medula óssea são alogênicas para o paciente. Em uma modalidade adicional, as células alogênicas da medula óssea são administradas em uma quantidade de cerca de 1×10^8 células a cerca de 3×10^8 células por kg de peso corporal.

As células-tronco mesenquimais são administradas em uma quantidade eficaz para tratar a doença ou o distúrbio genético em um animal. Em uma modalidade, as células-tronco mesenquimais são administradas em uma quantidade de cerca de 1×10^8 MSCs por quilograma (kg) de peso corporal a cerca de 10×10^8 MSCs por kg de peso corporal. Em outra modalidade, as células-tronco mesenquimais são administradas em uma quantidade de cerca de 4×10^6 MSCs por kg de peso corporal a cerca de 8×10^6 MSCs por kg de peso corporal. Ainda em outra modalidade, as células-tronco mesenquimais são administradas em uma quantidade de cerca de 8×10^6 MSCs por kg de peso corporal. As células-tronco mesenquimais podem ser administradas uma vez, ou podem ser administradas duas ou mais vezes em intervalos periódicos de cerca de 3 dias a cerca de 7 dias, ou as células-tronco mesenquimais podem ser administradas cronicamente, ou

seja, durante toda a vida do animal, em intervalos periódicos de cerca de 1 mês a cerca de 12 meses. A quantidade de células-tronco mesenquimais a serem administradas e a frequência de administração dependem de diversos fatores, incluindo a idade, o peso e sexo do paciente, a doença ou o distúrbio genético a ser tratado, e a extensão e a gravidade deste.

As células-tronco mesenquimais podem ser administradas em conjunto com um veículo farmacêutico aceitável. Por exemplo, as células-tronco mesenquimais podem ser administradas como uma suspensão de células em um meio líquido para injeção farmacêuticamente aceitável. Em uma modalidade, o meio líquido farmacêuticamente aceitável é uma solução salina. A solução salina pode conter materiais adicionais, tais como dimetil-sulfóxido (DMSO) e albumina sérica humana.

A invenção será agora descrita com relação aos exemplos seguintes; no entanto, o escopo da presente invenção não deve ser por eles limitado.

Exemplo 1 - Células-tronco mesenquimais para o tratamento de fibrose cística

O aumento da persistência das MSCs doador pode ser obtido por redução da população de MSCs do hospedeiro através do uso de irradiação total do corpo e/ou por procedimentos quimioablativos ou não ablativos, antes da liberação de MSCs do doador ao paciente. Esse procedimento fornece um nicho aberto para enxerto de MSCs do doador (integração de tecido) e foi previamente demonstrado que aumenta a migração de MSCs para a medula óssea. Além da infusão de MSCs, a liberação de células da medula óssea também será necessária para reconstruir o sistema hematopoiético do paciente, que pode ser destruído pelos métodos usados para reduzir o número de MSCs do hospedeiro na medula óssea do paciente.

As MSCs podem ser liberadas por infusão ou injeção intravenosa diretamente na cavidade da medula óssea (injeção intra-óssea). Embora a liberação intravenosa de MSCs possa ser suficiente para a integração bem-sucedida de MSCs dentro da medula óssea do receptor, a injeção intra-óssea pode aumentar a persistência do enxerto de MSCs. O enxerto rápido

de MSCs do doador deve aumentar a probabilidade de que a população derivada exogenamente esteja bem-establishada antes da expansão de quaisquer MSCs nativas que permanecem após os procedimentos ablativos.

Um modelo em rato de transplante de medula óssea após irradiação é usado atualmente para testar a hipótese de que a liberação intravenosa (IV) ou intra-óssea (IO) de MSCs, concomitantemente com um transplante de medula óssea, resulta em enxerto após procedimentos ablativos. O protocolo também foi projetado para obter uma medida comparativa preliminar do sucesso relativo dos dois procedimentos de liberação de MSCs.

No dia 0, doze machos de ratos Lewis foram irradiados com 2 frações de 5,0 Grays (Gy). As frações de radiação foram separadas por 4 horas. No dia seguinte, foram preparadas células da medula óssea (BMCs) por mais 8-10 machos de ratos Fisher. Para a injeção, foi usado um total de 30×10^6 de BMCs e 1×10^6 de MSCs em um volume total de 150 μ l. As MSCs usadas nesse procedimento carregavam o marcador genético fosfatase alcalina placentária humana (hPAP) para posterior detecção. O design experimental desse estudo é mostrado na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Design do estudo. Alocação por grupo experimental.

Grupo	Número de camundongos receptores	Tratamento	Irradiação total do corpo 1º Dia	BMT Dia 0
1	4 machos de ratos Lewis	Controle (sem injeção)	10 Gy*	Nenhuma
2	4 machos de ratos Lewis	Injeção tibial (células da medula + hPAP)	10 Gy*	30×10^6 células BM 1×10^6 MSCs hPAP
3	4 machos de ratos Lewis	Infusão IV (células da medula + hPAP)	10 Gy*	30×10^6 células da medula 1×10^6 MSCs hPAP

* A radiação foi dividida em 2 frações de 5,0 Gy. As frações de radiação foram separadas por 4 horas.

Os animais no grupo 1 (controle) receberam apenas radiação. Os animais no grupo 2 foram injetados com MSCs e células da medula ós-

sea diretamente na cabeça da tíbia esquerda através do ligamento patelar. Os animais no grupo 3 foram injetados com MSCs e células da medula óssea por via intravenosa.

Os animais foram pesados e observados diariamente, e qualquer animal que apresentasse sinais evidentes de dor como, por exemplo, agitação e/ou contorção da cabeça, era tratado com buprenorfina. A buprenorfina era administrada em uma concentração de 0,5 mg/kg (de ração) em 6 ml de ração macia diária. Esse tratamento começava quando os animais perdiam 15% de seu peso corporal, e continuava até a eutanásia programada ou até que a perda de peso fosse maior do que 30%. Aqueles animais incapazes de se recuperar, que estivessem frios ao toque ou moribundos foram submetidos à eutanásia.

Os animais foram pesados e observados por 14 dias. No 14^o dia, todos os animais foram sacrificados e a medula óssea foi coletada de cada tíbia. As amostras da medula foram coletadas em tubos, lacradas e embaladas em gelo até que fossem plaqueadas para os testes.

A medula óssea de cada amostra era então plaqueada para o ensaio de unidade de formação de colônias. As placas são coradas para expressão do gene hPAP. A porcentagem de MSCs derivadas exogenamente é determinada após contagem do número de colônias compostas por MSCs coradas (derivadas exogenamente) vs. não coradas (derivadas do receptor). Os dados resultantes fornecem uma avaliação inicial para determinar se a liberação IV ou IO é mais eficiente no estabelecimento do enxerto de células derivadas do doador.

Foram feitos estudos de acompanhamento de forma similar, mas que envolvem indivíduos experimentais que são sacrificados em momentos posteriores após o transplante. Dessa forma, é determinada a persistência do enxerto de MSCs. O método de liberação de MSCs para esses experimentos posteriores será determinado por estudos-piloto similares àqueles descritos acima.

Após os procedimentos para a obtenção de um enxerto de MSCs persistente terem sido feitos no modelo em rato descrito acima, é de-

envolvido modelo em rato de lesão pulmonar fibrótica. Os ratos que receberam um transplante de MSCs recebem a administração de irradiação localizada nos pulmões. Em vários pontos do tempo após a irradiação, os animais são sacrificados e os pulmões analisados quanto à presença de MSCs por PCR ou imunistoquímica. A migração significativa de MSCs para os pulmões após a lesão por radiação sugere que as MSCs também podem participar da cicatrização de vários outros tipos de lesão pulmonar fibrótica.

A causa subjacente da lesão pulmonar fibrótica em pacientes que sofrem de fibrose cística é um defeito genético. Se as MSCs forem obtidas de um individual geneticamente normal e transplantadas em pacientes com fibrose cística, a migração das células transplantadas para os pulmões em resposta aos sinais inflamatórios associados à lesão fibrótica produziriam uma inibição da progressão dos sintomas da doença, ou possivelmente até mesmo a reversão dos sinais clínicos. O grau de melhora seria determinado pelo nível de substituição do tecido que reveste os pulmões. O modelo em rato descrito acima, no qual os indivíduos experimentais com MSCs rastreáveis recebem a administração de radiação localizada nos pulmões, é um substituto para a lesão pulmonar fibrótica que ocorre na fibrose cística.

Dependendo do resultado final das administrações intravenosas e intra-ósseas de MSCs aos ratos descritas anteriormente no Exemplo 1, um paciente com fibrose cística recebe uma infusão intravenosa ou uma injeção intra-óssea de MSCs ($2,5 \times 10^6$ células/ml) em solução salina PlasmaLyteA (Baxter), à qual foi adicionado DMSO a 3,75% vol/vol e albumina sérica humana a 1,875% p/vol. A infusão prossegue até que os paciente recebam até 8 milhões de MSCs por quilograma de peso corporal. São feitas infusões subseqüentes de até 8 milhões de MSCs por quilograma de peso corporal, se necessário.

O regime de tratamento é repetido em intervalos de um mês. A função pulmonar é avaliada por espirometria. O tratamento prossegue até que não seja observada melhora dos sintomas clínicos.

Exemplo 2 - Células-tronco mesenquimais para o tratamento de doença de Wilson

Dependendo do resultado final das administrações intravenosas e intra-ósseas de MSCs aos ratos descritas anteriormente no Exemplo 1, um paciente com doença de Wilson recebe a administração de uma infusão intravenosa ou uma injeção intra-óssea de MSCs ($2,5 \times 10^6$ células/ml) em solução salina PlasmaLyteA (Baxter) à qual foi adicionado DMSO a 3,75% vol/vol e albumina sérica humana a 1,875% p/vol. A infusão prossegue até que o paciente receba até 8 milhões de MSCs por quilograma de peso corporal. São administradas infusões subseqüentes de até 8 milhões de MSCs por quilograma de peso corporal, se necessário.

O regime de tratamento é repetido em intervalos de um mês. Os sintomas clínicos são monitorados medindo-se a ceruloplasmina sérica, os níveis de cobre no sangue e na urina, e com exames de imagem do fígado (ou seja, raios X abdominal ou MRI). O tratamento continua até que não seja observada melhora dos sintomas clínicos.

Exemplo 3 - Células-tronco mesenquimais para o tratamento de esclerose lateral amiotrófica (ALS)

Dependendo do resultado final das administrações intravenosas e intra-ósseas de MSCs aos ratos descritas anteriormente no Exemplo 1, um paciente com ALS recebe a administração de uma infusão intravenosa ou de uma injeção intra-óssea de MSCs ($2,5 \times 10^6$ células/ml) em solução salina PlasmaLyteA (Baxter) à qual foi adicionado DMSO a 3,75% vol/vol e albumina sérica humana a 1,875% p/vol. A infusão prossegue até que o paciente receba até 8 milhões de MSCs por quilograma de peso corporal. São administradas infusões subseqüentes de até 8 milhões de MSCs por quilograma de peso corporal, se necessário.

O regime de tratamento é repetido em intervalos de um mês. Os sintomas clínicos são monitorados por testes neurológicos, eletromiograma (EMG) para testar a atividade muscular e testes da velocidade de condução nervosa (NCV) para avaliar a função nervosa. O tratamento continua até que não seja observada melhora da função motora.

As descrições de todas as patentes, publicações, incluindo pedidos publicados de patentes, números de acesso de depósito e números de

acesso em bases de dados são aqui incorporadas por referência na mesma extensão como se cada patente, publicação, número de aceso de depósito e número de acesso em bases de dados fosse específica e individualmente aqui incorporado por referência.

- 5 Deve-se entender, no entanto, que o escopo da presente invenção não se limita às modalidades específicas descritas acima. A invenção pode ser praticada de uma forma diferente das aqui descritas particularmente, e ainda estará dentro do escopo das reivindicações que a acompanham.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de tratamento de uma doença ou um distúrbio genético em um animal em que a referida doença ou distúrbio genético é caracterizado por pelo menos um de um tecido ou órgão inflamado do referido animal, o referido método compreendendo:
- 5 a administração ao referido animal de células-tronco mesenquimais em uma quantidade eficaz para tratar a referida doença ou distúrbio genético no referido animal.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida
- 10 doença ou distúrbio genético é fibrose cística.
3. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida doença ou distúrbio genético é doença renal policística.
4. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida doença ou distúrbio genético é doença de Wilson.
- 15 5. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida doença ou distúrbio genético é esclerose lateral amiotrófica.
6. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida doença ou distúrbio genético é distrofia muscular de Duchenne.
7. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida
- 20 doença ou distúrbio genético é distrofia muscular de Becker.
8. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida doença ou distúrbio genético é doença de Gaucher.
9. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida doença ou distúrbio genético é mal de Parkinson.
- 25 10. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida doença ou distúrbio genético é mal de Alzheimer.
11. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida doença ou distúrbio genético é doença de Huntington.
12. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida
- 30 doença ou distúrbio genético é síndrome de Charcot-Marie-Tooth.
13. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida doença ou distúrbio genético é síndrome de Zellweger.

14. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida doença ou distúrbio genético é síndrome poliglandular auto-imune.
15. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida doença ou distúrbio genético é síndrome de Marfan.
- 5 16. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida doença ou distúrbio genético é síndrome de Werner.
17. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida doença ou distúrbio genético é adrenoleucodistrofia.
18. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida
10 doença ou distúrbio genético é síndrome de Menkes.
19. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida doença ou distúrbio genético é osteopetrose infantil maligna.
20. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida doença ou distúrbio genético é ataxia espinocerebelar.
- 15 21. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida doença ou distúrbio genético é atrofia muscular espinhal.
22. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida doença ou distúrbio genético é malabsorção de glicose e galactose.
23. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as referi-
20 das células-tronco mesenquimais são administradas por via intravenosa.
24. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as referi- das células-tronco mesenquimais são administradas por via intra-óssea.
25. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as referi- das células-tronco mesenquimais são administradas em uma quantidade de
25 cerca de 1×10^6 MSCs por kg de peso corporal a cerca de 10×10^6 MSCs por kg de peso corporal.
26. Método de acordo com a reivindicação 25, em que as referi- das células-tronco mesenquimais são administradas em uma quantidade de
cerca de 4×10^6 MSCs por kg de peso corporal a cerca de 8×10^6 MSCs
30 por kg de peso corporal.
27. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o referido animal é um ser humano.

RESUMO

Patente de Invenção: **"USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS E DISTÚRBIOS GENÉTICOS"**.

5 A presente invenção refere-se a um método de tratamento de uma doença ou um distúrbio genético como, por exemplo, fibrose cística, doença de Wilson, esclerose lateral amiotrófica ou doença renal policística em um animal, que compreende a administração ao referido animal de células-tronco mesenquimais em uma quantidade eficaz para tratar a doença ou o distúrbio genético no animal.