



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

(21) PI 0717150-1 A2



* B R P I 0 7 1 7 1 5 0 A 2 *

(62) Data de Depósito do Pedido Original:

PI0621691 - 19/12/2006

(22) Data de Depósito: 26/09/2007

(43) Data da Publicação: 15/10/2013

(RPI 2232)

(51) Int.Cl.:

C12N 5/00

C12N 5/16

(54) Título: CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E USOS PARA AS MESMAS

(30) Prioridade Unionista: 02/10/2006 US 1/541,853

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

(72) Inventor(es): Mark Pittenger, Sudepta Aggarwal, Timothy Varney

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2007020724 de 26/09/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/042174de 10/04/2008

(57) Resumo: MÉTODO E APARELHO PARA TRANSMITIR DADOS. Uma implementação fornece um transmissor que separa porções sequenciais de dados em um primeiro conjunto de dados por intervalos de tempo permitindo um modo de economia de energia (1005). O transmissor transmite as porções sequenciais de dados separadas por respectivos intervalos de tempo tendo comprimentos configurados para permitir um receptor entrar e sair de um modo de economia de energia entre as porções de dados de recepção sequencialmente transmitidas do primeiro conjunto de dados (1010). O transmissor separa as porções sequenciais de dados em um segundo conjunto por intervalos de tempo que não são de comprimento suficiente para permitir um receptor entrar e sair de um modo de economia de energia durante os intervalos de tempo (1015). O segundo conjunto de dados é depois transmitido (1020).

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"USOS DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS"**.

A presente invenção foi efetuada com o apoio do Governo sob N° de Contrato N66001-02-C-8068 concedido pelo Departamento da Marinha. O Governo tem certos direitos nesta invenção.

Este pedido é uma continuação em parte do pedido N° de Série 11/080.298, depositado em 15 de março de 2005, que reivindica prioridade com base no pedido provisório N° de Série 60/555.118, depositado em 22 de março de 2004, cujos conteúdos são incorporados por referência em cada aspecto.

Esta invenção refere-se às células-tronco mesenquimais. Mais particularmente, esta invenção refere-se aos novos usos para as células-tronco mesenquimais, incluindo a promoção da angiogênese em diversos tecidos e órgãos, o tratamento de doenças autoimunes, o tratamento de respostas alérgicas, o tratamento de câncer, o tratamento de doenças e distúrbios inflamatórios, a promoção da cicatrização da ferida, o tratamento de inflamação, e a restauração do dano epitelial.

As células-tronco mesenquimais (MSCs) são células-tronco multipotentes que podem diferenciar-se prontamente em linhagens que incluem os osteoblastos, os miócitos, os condrócitos e os adipócitos (Pittenger e outros, Science, Vol. 284, p. 143 (1999); Haynesworth, e outros, Bone, Vol. 13, p. 69 (1992); Prockop, Science, Vol. 276, p. 71 (1997)). Os estudos *in vitro* têm demonstrado a capacidade das MSCs de diferenciar-se em músculo (Wakitani, e outros, Muscle Nerve, Vol. 18, p. 1417 (1995), precursores tipo neuronais (Woodbury, e outros, J. Neurosci. Res., Vol. 69, p. 908 (2002); Sanchez-Ramos, e outros, Exp. Neurol., Vol. 171, p. 109 (2001)), cardiomiócitos (Toma, e outros, Circulation, Vol. 105, p. 93 (2002); Fakuta, Artif. Organs, Vol. 25, p. 185 (2001)) e possivelmente outros tipos de células. Além disso, as MSCs foram mostradas proporcionar camadas alimentadoras efetivas para a expansão de células-tronco hematopoéticas e embrionárias (Eaves, e outros, Ann. N.Y. Acad. Sci., Vol. 938, p. 63 (2001); Wagers, e outros, Gene Therapy, Vol. 9, p. 606 (2002)). Os estudos recentes com uma varie-

5 dade de modelos de animais têm mostrado que as MSCs podem ser úteis na
 restauração ou regeneração de osso lesionado, cartilagem, menisco ou tecidos
 miocárdicos (DeKok, e outros, Clin. Oral Implants Res., Vol. 14, p. 481
 (2003)); Wu, e outros, Transplantation, Vol. 75, p. 679 (2003); Noel, e outros,
 10 Curr. Opin. Investig. Drugs, Vol. 3, p. 1000 (2002); Ballas, e outros, J. Cell.
Biochem. Suppl., Vol. 38, p. 20 (2002); Mackenzie, e outros, Blood Cells Mol.
Dis., Vol. 27 (2002)). Diversos investigadores têm usado as MSCs com re-
 sultados encorajadores para o transplante em modelos de doenças em ani-
 mais, incluindo a osteogênese imperfeita (Pereira, e outros, Proc. Nat. Acad.
 15 Sci., Vol. 95, p. 1142 (1998)), o parkinsonismo (Schwartz, e outros, Hum.
Gene Ther., Vol. 10, p. 2539 (1999)), a lesão do cordão espinhal (Chopp, e
 outros, Neuroreport, Vol. 11, p. 3001 (2000); Wu, e outros, J. Neurosci. Res.,
 Vol. 72, p. 393 (2003)) e os distúrbios cardíacos (Tomita, e outros, Circulati-
on, Vol. 100, p. 247 (1999). Shake, e outros, Ann. Thorac. Surg., Vol. 73, p.
 20 1919 (2002)). De modo importante, resultados promissores também têm sido
 relatados em ensaios clínicos para osteogênese imperfeita (Horwitz, e outros,
Blood, Vol. 97, p. 1227 (2001); Horowitz, e outros Proc. Nat. Acad. Sci., Vol.
 99, p. 8932 (2002)) e enxerto melhorado de transplantes de medula óssea
 heterólogos (Frassoni, e outros, Int. Society for Cell Therapy, SA006 (resu-
 mo) (2002); Koc, e outros, J. Clin. Oncol., Vol. 18, p. 307 (2000)).

25 As MSCs expressam o antígeno de complexo principal de histo-
 compatibilidade (MHC) classe I sobre a sua superfície, porém não expres-
 sam o MCH classe II (Le Blanc, e outros, Exp. Hematol., Vol. 31, p. 890
 (2003); Potian, e outros, J. Immunol., Vol. 171, p. 3426 (2003)) e nenhuma
 30 molécula coestimuladora B7 ou CD40 (Majumdar, e outros, J. Biomed. Sci.,
 Vol. 10, p. 228 (2003)), sugerindo que estas células têm um fenótipo pouco
 imunogênico (Tse, e outros, Transplantation, Vol. 75, p. 389 (2003)). As
 MSCs também inibem as respostas proliferativas de células T em um modo
 independente do MHC (Bartholomew, e outros, Exp. Hematol., Vol. 30, p. 42
 (2002); Devine, e outros, Cancer J., Vol. 7, p. 576 (2001); DiNicola, e outros,
Blood, Vol. 99, p. 3838 (2002)). Estas propriedades imunológicas das MSCs
 podem melhorar o seu enxerto de transplante e limitar a capacidade do sis-

tema imunológico receptor de reconhecer e rejeitar as células alogênicas após o transplante. A produção de fatores pelas MSCs, que modulam a resposta imune e suportam a hematopoese com a sua capacidade de diferenciar-se em tipos apropriados de células sob estímulos locais, as torna células-tronco desejáveis para o estudo de transplante celular (Majumdar, e outros, Hematother. Stem Cell Res., Vol. 9, p. 841 (2000); Haynesworth, e outros, J. Cell. Physiol., Vol. 166, p. 585 (1996).

As requerentes agora examinaram as interações das células-tronco mesenquimais com as populações isoladas de células imunes, incluindo as células dendríticas (DC1 e DC2), as células T efectoras (Th1 e Th2), e as células NK. Com base em tais interações, os requerentes descobriram que as células-tronco mesenquimais podem regular a produção de diversos fatores que podem regular diversas etapas no processo de resposta imune. Assim, as células-tronco mesenquimais podem ser empregadas no tratamento de condições de doenças e distúrbios que envolvam o sistema imune, ou doenças, condições, ou distúrbios que envolvam inflamação, dano epitelial, ou respostas alérgicas. Tais doenças, condições, e distúrbios incluem, porém não estão limitados às doenças autoimunes, alergias, artrite, feridas inflamadas, alopecia em áreas (calvície), doenças periodontais, incluindo gengivite e periodontite, e outras doenças, condições ou distúrbios que envolvam uma resposta imune.

Além disso, acredita-se que as células-tronco mesenquimais expressem e secretem o fator do crescimento endotelial vascular, ou VEGF, o qual promove a angiogênese por estímulo da formação de novos vasos sanguíneos. As células-tronco mesenquimais também estimulam as células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs) a produzir o VEGF.

Ademais, acredita-se que as células-tronco mesenquimais estimulem as células dendríticas (DCs) a produzir o Interferon-Beta (IFN- β), o qual promove a supressão do tumor e a imunidade contra a infecção viral.

De acordo com um aspecto da presente invenção, proporciona-se um método de tratar uma doença selecionada a partir do grupo que consiste em doenças autoimunes e doença do enxerto versus hospedeiro em

um animal. O método compreende administrar ao animal as células-tronco mesenquimais em uma quantidade eficaz para tratar a doença no animal.

Embora o escopo deste aspecto da presente invenção não seja para estar limitado a qualquer raciocínio teórico, acredita-se que pelo menos
5 um mecanismo pelo qual as células-tronco mesenquimais suprimem a doença autoimune e a doença do enxerto versus hospedeiro seja causando a liberação da Interleucina-10 (IL-10) das células T reguladoras (células T_{reg}) e/ou das células dendríticas (DC).

As doenças autoimunes que podem ser tratadas de acordo com
10 a presente invenção incluem, porém não estão limitadas à esclerose múltipla, diabetes Tipo 1, artrite reumatóide, uveíte, doença autoimune da tireóide, doença inflamatória do intestino, escleroderma, doença de Grave, lupo, doença de Crohn, doença autoimune linfoproliferativa (ALPS), doença desmielinizante, encefalomielite autoimune, gastrite autoimune (AIG), e doenças autoimunes glomerulares. Também, conforme observado acima, a doença do enxerto versus hospedeiro pode ser tratada. É para ser entendido, entretanto, que
15 o escopo da presente invenção não é para estar limitado ao tratamento das doenças específicas mencionadas neste documento.

Em uma modalidade, o animal ao qual são administradas as células-tronco mesenquimais é um mamífero. O mamífero pode ser um primata,
20 incluindo os primatas humanos e não-humanos.

Em geral, a terapia de célula-tronco mesenquimal (MSC) é baseada, por exemplo, na seguinte seqüência: coleta do tecido contendo as MSCs, isolamento e expansão das MSCs, e administração das MSCs ao
25 animal, com ou sem manipulação bioquímica ou genética.

As células-tronco mesenquimais que são administradas podem ser uma composição homogênea ou podem ser uma população de células mistas enriquecida em MSCs. As composições homogêneas de células-tronco mesenquimais podem ser obtidas por cultivo de células aderentes da
30 medula ou do perióstio, ou as células-tronco mesenquimais podem ser identificadas por marcadores específicos da superfície celular, os quais são identificados com anticorpos monoclonais únicos. Um método para obter uma

população celular enriquecida em células-tronco mesenquimais é descrito, por exemplo, na Patente U.S. Nº 5.486.359. As fontes alternativas para as células-tronco mesenquimais incluem, porém não estão limitadas ao, sangue, pele, sangue do cordão, músculo, gordura, osso, e pericôndrio.

5 As células-tronco mesenquimais podem ser administradas por uma variedade de procedimentos. As células-tronco mesenquimais podem ser administradas sistemicamente, tal como por administração intravenosa, intra-arterial, ou intraperitoneal.

10 As células-tronco mesenquimais podem ser a partir de um espectro de fontes, incluindo autólogas, alogênicas, ou xenogênicas.

 As células-tronco mesenquimais são administradas em uma quantidade eficaz para tratar uma doença autoimune ou doença do enxerto versus hospedeiro em um animal. As células-tronco mesenquimais podem ser administradas em uma quantidade de cerca de 1×10^5 células/kg a cerca de 1×10^7 células/kg. Em uma outra modalidade, as células-tronco mesenquimais são administradas em uma quantidade de cerca de 1×10^6 células/kg a cerca de 5×10^6 células/kg. A quantidade de células-tronco mesenquimais a serem administradas é dependente de uma variedade de fatores, incluindo a idade, o peso, e o sexo do paciente, a doença autoimune a ser tratada, e a sua proporção e gravidade.

20 As células-tronco mesenquimais podem ser administradas em conjunção com um veículo farmacêutico aceitável. Por exemplo, as células-tronco mesenquimais podem ser administradas como uma suspensão de células em um meio líquido farmacêuticamente aceitável ou um gel para aplicação por injeção ou tópica.

25 De acordo com um outro aspecto da presente invenção, proporciona-se um método de tratar uma resposta inflamatória em um animal. O método compreende a administração ao animal de células-tronco mesenquimais em uma quantidade eficaz para tratar a resposta inflamatória no animal.

30 Embora o escopo deste aspecto da presente invenção não seja para estar limitado a qualquer raciocínio teórico, acredita-se que as células-

tronco mesenquimais promovam a maturação das células T em células T reguladoras (T_{reg}), com isso controlando as respostas inflamatórias. Também acredita-se que as células-tronco mesenquimais inibam as células auxilia-
 5 γ) em certas reações inflamatórias, tais como aquelas associadas com a psoríase, por exemplo.

Em uma modalidade, as respostas inflamatórias que podem ser tratadas são aquelas associadas à psoríase.

Em uma outra modalidade, as células-tronco mesenquimais po-
 10 dem ser administradas a um animal de modo tal que as células-tronco mesenquimais contatem as microglias e/ou os astrócitos no cérebro, para reduzir a inflamação, com o que as células-tronco mesenquimais limitam a neurodegeneração causada pelas células gliais ativadas em doenças ou distúrbios tais como a Doença de Alzheimer, a Doença de Parkinson, o acidente
 15 vascular cerebral, ou as lesões das células cerebrais.

Em mais uma outra modalidade, as células-tronco mesenquimais podem ser administradas a um animal, de modo tal que as células-tronco mesenquimais contatem os ceratinócitos e as células de Langerhans na epiderme da pele para reduzir a inflamação, conforme possa ocorrer na
 20 psoríase, na dermatite crônica, ou na dermatite de contato. Embora esta modalidade não seja para estar limitada a qualquer raciocínio teórico, acredita-se que as células-tronco mesenquimais possam contatar os ceratinócitos e as células de Langerhans na epiderme, e alterar a expressão dos receptores de células T e os perfis de secreção de citocina, resultando na expressão
 25 diminuída do fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$) e na população aumentada de células T reguladoras (célula T_{reg}).

Em uma modalidade adicional, as células-tronco mesenquimais podem ser usadas para reduzir a inflamação no osso, conforme ocorre na artrite e nas condições similares à artrite, incluindo, porém não limitadas à
 30 osteoartrite e artrite reumatóide, e nas outras doenças artríticas listadas no site da internet www.arthritis.org/conditions/diseases. Embora o escopo desta modalidade não seja pretendido para estar limitado a qualquer raciocínio

teórico, acredita-se que as células-tronco mesenquimais possam inibir a secreção de Interleucina-17 pelas células T da memória no fluido sinovial.

Em uma outra modalidade, as células-tronco mesenquimais podem ser usadas para limitar a inflamação no intestino e no fígado durante a
5 doença inflamatória do intestino e a hepatite crônica, respectivamente. Embora o escopo deste aspecto da presente invenção não seja pretendido para estar limitado a qualquer raciocínio teórico, acredita-se que as células-tronco mesenquimais promovam a secreção aumentada da Interleucina-10 (IL-10) e a geração de células T reguladoras (células T_{reg}).

10 Em uma outra modalidade, as células-tronco mesenquimais podem ser usadas para inibir a ativação excessiva de neutrófilos e macrófagos em condições patológicas, tais como a sepse e o trauma, incluindo a lesão por queimadura, a cirurgia, e os transplantes. Embora o escopo desta modalidade não seja para estar limitado a qualquer raciocínio teórico, acredita-se
15 que as células-tronco mesenquimais promovam a secreção de citocinas supressoras, tais como a IL-10, e inibam o fator inibitório da migração de macrófagos.

Em uma outra modalidade, as células-tronco mesenquimais podem ser usadas para controlar a inflamação em locais imunes privilegiados,
20 tais como o olho, incluindo a córnea, o cristalino, o epitélio pigmentado, e a retina, o cérebro, o cordão espinhal, o útero e a placenta de grávida, o ovário, os testículos, o córtex adrenal, o fígado, e os folículos capilares. Embora o escopo desta modalidade não seja para estar limitado a qualquer raciocínio teórico, acredita-se que as células-tronco mesenquimais promovam a secre-
25 ção de citocinas supressoras, tais como a IL-10, e a geração de células T_{reg}.

Em mais uma outra modalidade, as células-tronco mesenquimais podem ser usadas para tratar o dano ao tecido associado com infecções por doenças renais em estágios finais (ESRDs) durante a diálise e/ou a glomerulonefrite. Embora o escopo desta modalidade não seja para estar
30 limitado a qualquer raciocínio teórico, acredita-se que as células-tronco mesenquimais possam promover a restauração renal. As células-tronco mesenquimais também expressam e secretam o fator do crescimento endotelial

vascular, ou VEGF, o qual estimula a formação de novos vasos sanguíneos, o que deve auxiliar na restauração do tecido do rim lesionado.

Em uma modalidade adicional, as células-tronco mesenquimais podem ser usadas para controlar as infecções virais, tais como as infecções por influenza, hepatite C, Vírus do Herpes Simples, vírus da vacínia, e vírus Epstein-Barr. Embora o escopo desta modalidade não seja para estar limitado a qualquer raciocínio teórico, acredita-se que as células-tronco mesenquimais promovam a secreção de Interferon-Beta (IFN- β).

Em mais uma outra modalidade, as células-tronco mesenquimais podem ser usadas para controlar as infecções parasíticas, tais como as infecções por Leishmania e as infecções por Helicobacter. Embora o escopo desta modalidade não seja para estar limitado a qualquer raciocínio teórico, acredita-se que as células-tronco mesenquimais mediam as respostas pelas células auxiliaadoras T 2 (Th2), e com isso promovam a produção aumentada de imunoglobulina E (IgE) pelas células β .

É para ser entendido, entretanto, que o escopo deste aspecto da presente invenção não é para estar limitado ao tratamento de qualquer resposta inflamatória particular.

As células-tronco mesenquimais podem ser administradas a um mamífero, incluindo os primatas humanos e não-humanos, como acima descrito.

As células-tronco mesenquimais também podem ser administradas sistemicamente, conforme acima descrito. Alternativamente, no caso de osteoartrite ou artrite reumatóide, as células-tronco mesenquimais podem ser administradas diretamente a uma articulação artrítica.

As células-tronco mesenquimais são administradas em uma quantidade eficaz para tratar uma resposta inflamatória em um animal. As células-tronco mesenquimais podem ser administradas em uma quantidade de cerca de 1×10^5 células/kg a cerca de 1×10^7 células/kg. Em uma outra modalidade, as células-tronco mesenquimais são administradas em uma quantidade de cerca de 1×10^6 células/kg a cerca de 5×10^6 células/kg. A dosagem exata de células-tronco mesenquimais a serem administradas é

dependente de uma variedade de fatores, incluindo a idade, o peso, e o sexo do paciente, a resposta inflamatória que está sendo tratada, e o seu grau e gravidade.

5 As células-tronco mesenquimais podem ser administradas em
conjunção com um veículo farmacêutico aceitável, como acima descrito.

De acordo com um outro aspecto da presente invenção, proporciona-se um método de tratar inflamação e/ou restaurar o dano epitelial em um animal. O método compreende administrar ao animal as células-tronco mesenquimais em uma quantidade eficaz para tratar a inflamação e/ou o
10 dano epitelial no animal.

Embora o escopo deste aspecto da presente invenção não seja para estar limitado a qualquer raciocínio teórico, acredita-se que as células-tronco mesenquimais causem uma diminuição na secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e Interferon- γ pelas células T e um aumento na secreção das citocinas anti-inflamatórias Interleucina-10 (IL-10) e Interleucina-4
15 (IL-4) pelas células T. Também acredita-se que as células-tronco mesenquimais causem uma diminuição na secreção de Interferon- γ pelas células exterminadoras naturais (NK).

A inflamação e/ou o dano epitelial que podem ser tratados de acordo com este aspecto da presente invenção incluem, porém não estão limitados à inflamação e/ou dano epitelial causados por uma variedade de doenças e distúrbios, incluindo, porém não limitada à doença autoimune, rejeição de órgãos transplantados, queimaduras, cortes, lacerações, e úlceras, incluindo as úlceras da pele e as úlceras diabéticas.

25 Em uma modalidade, as células-tronco mesenquimais são administradas a um animal para restaurar o dano epitelial resultante de doenças autoimunes, incluindo, porém não limitadas à artrite reumatóide, Doença de Crohn, diabetes do Tipo 1, esclerose múltipla, escleroderma, Doença de Graves, lupo, doença inflamatória do intestino, gastrite autoimune (AIG), e doença
30 glomerular autoimune. As células-tronco mesenquimais também podem restaurar o dano epitelial resultante da doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD).

Este aspecto da presente invenção é aplicável particularmente à restauração de dano epitelial resultante da doença do enxerto versus hospedeiro, e mais particularmente, à restauração do dano epitelial resultante da doença do enxerto versus hospedeiro grave, incluindo a doença do enxerto versus hospedeiro de Graus III e IV que afetam a pele e/ou o sistema gastrointestinal. As requerentes descobriram, em particular, que as células-tronco mesenquimais, quando administradas a um paciente sofrendo de doença do enxerto versus hospedeiro grave, e em particular, doença do enxerto versus hospedeiro de Graus III e IV, a administração das células-tronco mesenquimais resultou na restauração da pele e/ou do tecido epitelial intestinal ulcerado no paciente.

Em uma outra modalidade, as células-tronco mesenquimais são administradas a um animal para restaurar o dano epitelial a um órgão ou tecido transplantado, incluindo, porém não limitado ao rim, coração, e pulmão, causado por rejeição do órgão ou tecido transplantado.

Em mais uma outra modalidade, as células-tronco mesenquimais são administradas a um animal para restaurar o dano epitelial causado por queimaduras, cortes, lacerações, e ulcerações, incluindo, porém não limitadas às ulcerações da pele e ulcerações diabéticas.

As células-tronco mesenquimais podem ser administradas a um mamífero, incluindo os primatas humanos e não-humanos, como acima descrito.

As células-tronco mesenquimais também podem ser administradas sistemicamente, conforme acima descrito.

As células-tronco mesenquimais são administradas em uma quantidade eficaz para restaurar o dano epitelial em um animal. As células-tronco mesenquimais podem ser administradas em uma quantidade de cerca de 1×10^5 células/kg a cerca de 1×10^7 células/kg. Em uma outra modalidade, as células-tronco mesenquimais são administradas em uma quantidade de cerca de 1×10^6 células/kg a cerca de 5×10^6 células/kg. A dosagem exata de células-tronco mesenquimais a serem administradas é dependente de uma variedade de fatores, incluindo a idade, o peso, e o sexo do paciente, o

tipo de dano epitelial que está sendo restaurado, e o seu grau e gravidade.

De acordo com mais um outro aspecto da presente invenção, proporciona-se um método de tratar câncer em um animal. O método compreende administrar ao animal as células-tronco mesenquimais em uma
5 quantidade eficaz para tratar o câncer no animal.

Embora o escopo deste aspecto da presente invenção não seja para estar limitado a qualquer raciocínio teórico, acredita-se que as células-tronco mesenquimais interajam com as células dendríticas, o que resulta na secreção de IFN- β , que, por sua vez, atua como um supressor do tumor. Os
10 cânceres que podem ser tratados incluem, porém não estão limitados ao carcinoma hepatocelular, câncer cervical, câncer pancreático, câncer da próstata, fibrossarcoma, meduloblastoma, e astrocitoma. É para ser entendido, entretanto, que o escopo da presente invenção não é para estar limitado a qualquer tipo específico de câncer.

15 O animal pode ser um mamífero, incluindo os primatas humanos e não-humanos, conforme acima descrito.

As células-tronco mesenquimais são administradas ao animal em uma quantidade eficaz para tratar o câncer no animal. Em geral, as células-tronco mesenquimais são administradas em uma quantidade de cerca de
20 1×10^5 células/kg a cerca de 1×10^7 células/kg. Em uma outra modalidade, as células-tronco mesenquimais são administradas em uma quantidade de cerca de 1×10^6 células/kg a cerca de 5×10^6 células/kg. A quantidade exata de células-tronco mesenquimais a serem administradas é dependente de uma variedade de fatores, incluindo a idade, o peso, e o sexo do paciente, o
25 tipo de câncer que está sendo tratado, e o seu grau e gravidade.

As células-tronco mesenquimais são administradas em conjunção com um veículo farmacêutico aceitável, e podem ser administradas sistemicamente, como acima descrito. Alternativamente, as células-tronco mesenquimais podem ser administradas diretamente ao câncer que está sendo
30 tratado.

De acordo com mais um outro aspecto da presente invenção, proporciona-se um método de tratar uma doença ou distúrbio alérgico em

um animal. O método compreende administrar ao animal as células-tronco mesenquimais em uma quantidade eficaz para tratar a doença ou o distúrbio alérgico no animal.

Embora o escopo deste aspecto da presente invenção não seja para estar limitado a qualquer raciocínio teórico, acredita-se que as células-tronco mesenquimais, quando administradas após uma resposta alérgica aguda, proporcionem a inibição da ativação e a desgranulação dos mastócitos. Também, acredita-se que as células-tronco mesenquimais inibam a ativação de basófilos e inibam as citocinas, tais como o TNF- α , as quimioquinas, tais como a Interleucina-8, e a proteína quimiotática de monócitos, ou MCP-1, os mediadores de lipídios, tais como os leucotrienos, e inibam os mediadores principais, tais como a histamina, a heparina, os sulfatos de condroitina, e a catepsina.

As doenças ou os distúrbios alérgicos que podem ser tratados incluem, porém não estão limitados à asma, rinite alérgica, dermatite atópica, e dermatite de contato. É para ser entendido, entretanto, que o escopo da presente invenção não é para estar limitado a qualquer doença ou distúrbio alérgico específico.

As células-tronco mesenquimais são administradas ao animal em uma quantidade eficaz para tratar a doença ou o distúrbio alérgico no animal. O animal pode ser um mamífero. O mamífero pode ser um primata, incluindo os primatas humanos e não-humanos. Em geral, as células-tronco mesenquimais são administradas em uma quantidade de cerca de 1×10^5 células/kg a cerca de 1×10^7 células/kg. Em uma outra modalidade, as células-tronco mesenquimais são administradas em uma quantidade de cerca de 1×10^6 células/kg a cerca de 5×10^6 células/kg. A dosagem exata é dependente de uma variedade de fatores, incluindo a idade, o peso, e o sexo do paciente, a doença ou o distúrbio alérgico que está sendo tratado, e o seu grau e gravidade.

As células-tronco mesenquimais podem ser administradas em conjunção com um veículo farmacêutico aceitável, conforme acima descrito. As células-tronco mesenquimais podem ser administradas sistemicamente,

tal como por administração intravenosa ou intra-arterial, por exemplo.

De acordo com um aspecto adicional da presente invenção, proporciona-se um método de promover a cicatrização da ferida em um animal. O método compreende administrar ao animal as células-tronco mesenquimais em uma quantidade eficaz para promover a cicatrização da ferida no animal.

Embora o escopo da presente invenção não seja para estar limitado a qualquer raciocínio teórico, acredita-se que, conforme acima mencionado, as células-tronco mesenquimais façam com que as células T_{reg} e as células dendríticas liberem a Interleucina-10 (IL-10). A IL-10 limita ou controla a inflamação em uma ferida, com isso promovendo a cicatrização de uma ferida.

Além disso, as células-tronco mesenquimais podem promover a cicatrização da ferida e a cicatrização da fratura por indução dos fatores de secreção por outros tipos de células. Por exemplo, as células-tronco mesenquimais podem induzir a liberação mediada pela prostaglandina E_2 (PGE_2) do fator do crescimento endotelial vascular (VEGF) pelas células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs), assim como a liberação mediada pela PGE_2 do hormônio do crescimento, insulina, fator do crescimento similar à insulina 1 (IGF-1), proteína de ligação ao fator do crescimento similar à insulina 3 (IGFBP-3), e endotelina-1.

As feridas que podem ser cicatrizadas incluem, porém não estão limitadas àsquelas resultantes de cortes, lacerações, queimaduras, e ulcerações da pele.

As células-tronco mesenquimais são administradas ao animal em uma quantidade eficaz para promover a cicatrização da ferida no animal. O animal pode ser um mamífero, e o mamífero pode ser um primata, incluindo os primatas humanos e não-humanos. Em geral, as células-tronco mesenquimais são administradas em uma quantidade de cerca de 1×10^5 células/kg a cerca de 1×10^7 células/kg. Em uma outra modalidade, as células-tronco mesenquimais são administradas em uma quantidade de cerca de 1×10^6 células/kg a cerca de 5×10^6 células/kg. A quantidade exata de células-

tronco mesenquimais a serem administradas é dependente de uma variedade de fatores, incluindo a idade, o peso, e o sexo do paciente, e o grau e a gravidade da ferida que está sendo tratada.

5 As células-tronco mesenquimais podem ser administradas em
conjunção com um veículo farmacêutico aceitável, como acima descrito. As
células-tronco mesenquimais podem ser administradas sistemicamente, co-
mo acima descrito. Alternativamente, as células-tronco mesenquimais po-
dem ser administradas diretamente a uma ferida, tal como em um fluido so-
bre um curativo ou reservatório contendo as células-tronco mesenquimais.

10 De acordo com mais um outro aspecto da presente invenção,
proporciona-se um método de tratar ou prevenir a fibrose em um animal. O
método compreende administrar ao animal as células-tronco mesenquimais
em uma quantidade eficaz para tratar ou prevenir a fibrose em um animal.

15 As células-tronco mesenquimais podem ser administradas ao
animal para tratar ou prevenir qualquer tipo de fibrose no animal, incluindo,
porém não limitada à cirrose do fígado, fibrose dos rins associada com uma
doença renal em estágio final, e fibrose dos pulmões, incluindo, porém não
limitada às Doenças Respiratórias Agudas (ARDS) e doença pulmonar obs-
trutiva (COPD). É para ser entendido que o escopo da presente invenção
20 não é para estar limitado a qualquer tipo específico de fibrose.

As células-tronco mesenquimais são administradas ao animal
em uma quantidade eficaz para tratar ou prevenir a fibrose no animal. O a-
nimal pode ser um mamífero, e o mamífero pode ser um primata, incluindo
os primatas humanos e não-humanos. Em geral, as células-tronco mesen-
25 quimais são administradas em uma quantidade de cerca de 1×10^5 célu-
las/kg a cerca de 1×10^7 células/kg. Em uma outra modalidade, as células-
tronco mesenquimais são administradas em uma quantidade de cerca de $1 \times$
 10^6 células/kg a cerca de 5×10^6 células/kg. A quantidade exata de células-
tronco mesenquimais a serem administradas é dependente de uma varieda-
30 de de fatores, incluindo a idade, o peso, e o sexo do paciente, e o grau e a
gravidade da fibrose que está sendo tratada ou prevenida.

As células-tronco mesenquimais podem ser administradas em

conjunção com um veículo farmacêutico aceitável, como acima descrito. As células-tronco mesenquimais podem ser administradas sistemicamente, também como acima descrito.

5 É um outro objetivo da presente invenção promover a angiogênese em um tecido ou órgão de um animal, onde tal tecido ou órgão está necessitado da angiogênese.

Assim, de acordo com um aspecto adicional da presente invenção, proporciona-se um método de promover a angiogênese em um órgão ou tecido de um animal. O método compreende administrar ao animal as
10 células-tronco mesenquimais em uma quantidade eficaz para promover a angiogênese em um órgão ou tecido do animal.

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de um leito microvascular preexistente.

A indução da angiogênese pode ser usada para tratar a insufici-
15 ência de artérias coronárias e periféricas, e assim, pode ser uma abordagem não invasiva e curativa para o tratamento de doença da artéria coronária, doença cardíaca isquêmica, e doença da artéria periférica. A angiogênese pode desempenhar uma função no tratamento de doenças e distúrbios em tecido e órgãos diferentes do coração, bem como no desenvolvimento e/ou
20 manutenção de órgãos diferentes do coração. A angiogênese pode proporcionar uma função no tratamento de feridas internas e externas, bem como úlceras dérmicas. A angiogênese também desempenha uma função na implantação de embriões, e crescimento placentário, bem como no desenvolvimento da vasculatura embriônica. A angiogênese também é essencial para
25 a união de reabsorção de cartilagem com formação de osso, e é essencial para a correta morfogênese da placa de crescimento.

Além disso, a angiogênese é necessária para a engenharia e a manutenção bem-sucedidas de órgãos altamente metabólicos, como o fígado, onde uma densa rede vascular é necessária para proporcionar nutriente
30 e transporte de gás suficientes.

As células-tronco mesenquimais podem ser administradas ao tecido ou ao órgão que está necessitado de angiogênese por uma variedade

de procedimentos. As células-tronco mesenquimais podem ser administradas sistemicamente, tal como por administração intravenosa, intra-arterial, ou intraperitoneal, ou as células-tronco mesenquimais podem ser administradas diretamente ao tecido ou órgão que está necessitado de angiogênese, tal como por injeção direta no tecido ou órgão que necessitada de angiogênese.

As células-tronco mesenquimais podem ser a partir de um espectro de fontes, incluindo autólogas, alogênicas, ou xenogênicas.

Embora o escopo da presente invenção não seja para estar limitado a qualquer raciocínio teórico, acredita-se que as células-tronco mesenquimais, quando administradas a um animal, estimulem as células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs) a produzir o fator do crescimento endotelial vascular, ou VEGF, o qual estimula a formação de novos vasos sanguíneos.

Em uma modalidade, o animal é um mamífero. O mamífero pode ser um primata, incluindo os primatas humanos e não-humanos.

As células-tronco mesenquimais, de acordo com a presente invenção, podem ser empregadas no tratamento, alívio, ou prevenção de qualquer doença ou distúrbio que possa ser aliviado, tratado, ou prevenido através da angiogênese. Assim, por exemplo, as células-tronco mesenquimais podem ser administradas a um animal para tratar as artérias bloqueadas, incluindo aquelas nas extremidades, isto é, braços, pernas, mãos, e pés, bem como no pescoço ou em vários órgãos. Por exemplo, as células-tronco mesenquimais podem ser usadas para tratar artérias bloqueadas que suprimem o cérebro, com isso tratando ou prevenindo o acidente vascular cerebral. Também, as células-tronco mesenquimais podem ser usadas para tratar os vasos sanguíneos nas córneas embrionárias e pós-natal e podem ser usadas para proporcionar estruturação glomerular. Em uma outra modalidade, as células-tronco mesenquimais podem ser empregadas no tratamento de feridas, tanto internas quanto externas, bem como no tratamento de úlceras dérmicas encontradas nos pés, mãos, pernas ou braços, incluindo, porém não limitadas às úlceras dérmicas causadas por doenças, tais como

diabete e anemia de células falciformes.

Além disso, porque a angiogênese está envolvida na implantação de embrião na formação de placenta, as células-tronco mesenquimais podem ser empregadas para promover a implantação de embrião e prevenir o aborto.

Ademais, as células-tronco mesenquimais podem ser administradas a um animal que está por nascer, incluindo os seres humanos, para promover o desenvolvimento da vasculatura no animal que está por nascer.

Em uma outra modalidade, as células-tronco mesenquimais podem ser administradas a um animal, nascido ou não, para promover a reabsorção de cartilagem e a formação de osso, bem como promover a correta morfogênese da placa epifisária.

As células-tronco mesenquimais são administradas em uma quantidade eficaz na promoção da angiogênese em um animal. As células-tronco mesenquimais podem ser administradas em uma quantidade de cerca de 1×10^5 células/kg a cerca de 1×10^7 células/kg. Em uma outra modalidade, as células-tronco mesenquimais são administradas em uma quantidade de cerca de 1×10^6 células/kg a cerca de 5×10^6 células/kg. A quantidade de células-tronco mesenquimais a serem administradas é dependente de uma variedade de fatores, incluindo a idade, o peso, e o sexo do paciente, a doença ou distúrbio a ser tratado, aliviado, ou prevenido, e o seu grau e gravidade.

As células-tronco mesenquimais podem ser administradas em conjunção com um veículo farmacêutico aceitável. Por exemplo, as células-tronco mesenquimais podem ser administradas como uma suspensão de células em um meio líquido farmacêuticamente aceitável para injeção. A injeção pode ser local, isto é, diretamente no tecido ou órgão necessitado de angiogênese, ou sistêmica.

As células-tronco mesenquimais podem ser geneticamente engenheiradas com um ou mais polinucleotídeos codificando um agente terapêutico. Os polinucleotídeos podem ser distribuídos para as células-tronco mesenquimais via um veículo de expressão apropriado. Os veículos de ex-

pressão que podem ser empregados para engenheirar geneticamente as células-tronco mesenquimais incluem, porém não estão limitados aos vetores retrovirais, vetores adenovirais, e vetores do vírus adeno-associado.

5 A seleção de um polinucleotídeo apropriado codificando um agente terapêutico é dependente de diversos fatores, incluindo a doença ou o distúrbio que está sendo tratado, e o seu grau e gravidade. Os polinucleotídeos que codificam os agentes terapêuticos, e os veículos de expressão apropriados são descritos adicionalmente na Patente U.S. Nº 6.355.239.

10 É para ser entendido que as células-tronco mesenquimais, quando empregadas nas terapias e nos tratamentos acima mencionados, podem ser empregadas em combinação com outros agentes terapêuticos conhecidos para aqueles versados na técnica, incluindo, porém não limitados aos fatores do crescimento, citocinas, fármacos, tais como os fármacos anti-inflamatórios, e células diferentes das células-tronco mesenquimais, tais como as células dendríticas, e podem ser administradas com veículos solúveis para células, tais como o ácido hialurônico, ou em combinação com matrizes sólidas, tais como colágeno, gelatina, ou outros polímeros biocompatíveis, conforme apropriado.

20 É para ser entendido que os métodos descritos neste documento podem ser realizados em diversos modos e com diversas modificações e permutações deles que são bastante conhecidos na técnica. Também pode ser apreciado que quaisquer teorias descritas quanto aos modos de ação ou interações entre os tipos de células não devem ser interpretadas como limitando esta invenção de modo algum, porém são apresentadas de modo tal que os métodos da invenção possam ser entendidos mais completamente.

25 A invenção será agora descrita em relação aos desenhos, em que:

Figura 1 As MSCs modulam as funções das células dendríticas. (A) Análise citométrica de fluxo das células monocíticas DC1 maduras usando anticorpos contra HLA-DR e CD11c e das células plasmacitóides DC2 usando anticorpos contra HLA-DR e CD123 (receptor de IL-3). (---): controle de isótipo; (—): anticorpos conjugados a FITC/PE. **(B)** As MSCs ini-

5 bem a secreção de $\text{TNF-}\alpha$ (eixo y primário) e aumentam a secreção de IL-10 (eixo y secundário) a partir de DC1 e DC2 ativadas, respectivamente. **(C)** As MSCs cultivadas com células DC1 maduras inibem a secreção de $\text{IFN-}\gamma$ (eixo y primário) pelas células T e aumentam os níveis de IL-4 (eixo y secundário) em comparação com a MSC ou a DC sozinha. A produção diminuída de $\text{IFN-}\gamma$ pró-inflamatório e a produção aumentada de IL-4 anti-inflamatória na presença de MSCs indicaram uma mudança na população de células T para um fenótipo anti-inflamatório.

Figura 2 As MSCs inibem a função das células T efetoras pró-inflamatórias. **(A)** Análise citométrica de fluxo dos números de células T_{Reg} (em %) por coloração das PBMCs ou fração não-aderente, em cultura de MSC+PBMC (MSC+PBMC) com anticorpos para CD4 conjugados a FITC (eixo x) e para CD25 conjugados a PE (eixo y). As portas são ajustadas com base nos anticorpos de controle de isótipo como fundo. Os gráficos são representativos de 5 experimentos independentes. **(B)** As células T_{H1} geradas na presença de MSCs secretaram níveis reduzidos de $\text{IFN-}\gamma$ (eixo y primário) e as células T_{H2} geradas na presença de MSCs secretaram quantidades aumentadas de IL-4 (eixo y secundário) nos sobrenadantes de culturas de células. **(C)** As MSCs inibem a secreção de $\text{IFN-}\gamma$ a partir das células NK purificadas, cultivadas por 0, 24, ou 48 horas em uma placa de 24 cavidades. Os dados mostrados são a média $\pm$ SD de secreção de citocina em um experimento e são representativos de 3 experimentos independentes.

Figura 3 As MSCs resultam em números aumentados de população de células T_{reg} e expressão aumentada de GITR. **(A)** Uma população de células T_{reg} CD4^+ CD25^+ a partir de culturas de PBMC ou MSC + PBMC (razão de MSC para PBMC de 1:10) (cultivadas sem nenhuma estimulação adicional por 3 dias) foi isolada usando um procedimento de isolamento magnético de 2 etapas. Estas células foram irradiadas (para bloquear qualquer proliferação adicional) e usadas como estimuladores em uma reação de linfócitos mistos (MLR) onde os respondedores eram as PBMCs alogênicas (razão de estimulador para respondedor de 1:100) na presença de fitoemaglutinina (PHA) (2,5 mg/ml). As células foram cultivadas por 48 horas,

após o que a ^3H timidina foi adicionada, e a radioatividade incorporada foi contada após 24 horas. Os resultados mostraram que a população de T_{reg} gerada na presença de MSCs (caminho 3) era funcionalmente similar às células T_{reg} geradas na ausência de MSCs (caminho 2). **(B)** As PBMCs foram cultivadas por 3 dias na ausência (gráfico superior) ou na presença (gráfico inferior) de MSCs (razão de MSC para PBMC de 1:10), após o que a fração não-aderente foi coletada e imunocolorida com GITR marcado com FITC e CD4 marcada com PE. Os resultados mostram um aumento maior do que duas vezes na expressão de GITR nas células cultivadas na presença de MSCs.

Figura 4 As MSCs produzem PGE_2 e o bloqueio da PGE_2 inverte os efeitos imunomoduladores mediados pelas MSCs. (A) Secreção de PGE_2 (média $\pm$ SD) em sobrenadantes da cultura obtidos de MSCs cultivadas na presença ou na ausência dos bloqueadores de PGE_2 NS-398 ou indometacina (Indomet.) em diversas concentrações. As concentrações de inibidores estão em μM e os dados apresentados são valores obtidos após 24 horas de cultura. **(B)** Expressão de COX-1 e COX-2 nas MSCs e nas PBMCs usando RT-PCR em tempo real. As MSCs expressaram níveis significativamente maiores de COX-2 em comparação com as PBMCs e, quando as MSCs foram cultivadas na presença das PBMCs, houve um aumento de >3 vezes na expressão de COX-2 nas MSCs. São mostrados os dados representativos a partir de 1 de 3 experimentos independentes. As culturas de MSC+PBMC foram fixadas em uma placa de câmara de trans-poços onde as MSCs foram preparadas em placas sobre a câmara inferior e as PBMCs sobre a câmara superior. **(C)** A presença dos bloqueadores de PGE_2 indometacina (Ind.) ou NS-398 aumenta a secreção de $\text{TNF-}\alpha$ a partir das DCs ativadas ($\square$) e a secreção de $\text{IFN-}\gamma$ a partir das células $T_{\text{H}1}$ ($\blacksquare$) em comparação com os controles. Os dados foram calculados como % de alteração a partir das culturas geradas na ausência de MSCs e inibidores de PGE_2 . **(C)** A presença dos bloqueadores de PGE_2 indometacina (Indo) e NS-398 durante o cocultivo de MSC-PBMC (1:10) inverte os efeitos antiproliferativos mediados pelas MSCs sobre as PBMCs tratadas com PHA. Os dados mostrados

são a partir de um experimento e são representativos de 3 experimentos independentes.

Figura 5 A secreção de citocinas em MSCs constitutivas é elevada na presença das PBMCs alogênicas. Usando as MSCs humanas previamente caracterizadas, analisaram-se os níveis das citocinas IL-6 e VEGF, mediador de lipídio PGE₂, e metaloproteinase de matriz 1 (pro-MMP-1) no sobrenadante de cultura de MSCs cultivadas por 24 horas na presença (barras com hachuras) ou na ausência (barras abertas) de PBMCs (razão de MSC para PBMC de 1:10). As MSCs produziram IL-6, VEGF, e PGE₂ constitutivamente, e os níveis destes fatores aumentaram no cocultivo com as PBMCs, desse modo sugerindo que as MSCs podem desempenhar uma função na modulação das funções imunes em uma indicação inflamatória.

Figura 6 As MSCs inibem a proliferação de células T induzida por mitógeno em um modo dependente da dose. Os números crescentes de PBMCs alogênicas foram incubados com números constantes de MSCs (2.000 células/cavidade) preparadas sobre uma placa de 96 cavidades, na presença ou na ausência de PHA (2,5 mg/ml), por 72 horas, e a incorporação de ³H timidina determinada (em contagens por minuto, ou cpm). Houve uma inibição dependente da dose da proliferação das PBMCs tratadas com PHA na presença das MSCs. Os resultados representativos a partir de 1 de 3 experimentos independentes são mostrados. Resultados similares foram descritos por LeBlanc, e outros, Scand J. Immunol., Vol. 57, p. 11 (2003).

Figura 7 Diagrama esquemático do mecanismo de ação proposto das MSCs

As MSCs mediam os seus efeitos imunomoduladores afetando as células dos sistemas imunes tanto inatos (DCs - vias 2-4; e NK - via 6) quanto adaptativos (T - vias 1 e 5 e B - via 7). Em resposta a um patógeno invasor, as DCs imaturas migram para o local de entrada potencial, amadurecem e adquirem uma capacidade de prover as células T simples (por meio de sinais específicos para antígenos e coestimuladores) para tornarem-se células T efetoras protetoras (imunidade de T_H1 mediada por células ou de

T_H2 humoral). Durante a interação entre MSC-DC, as MSCs, por meio de contato direto entre célula-célula ou via fator secretado, podem alterar o resultado da resposta imune por limitação da capacidade das DCs de organizarem uma resposta mediada por célula (via 2) ou por promoção da capacidade de organizar uma resposta humoral (via 4). Também, quando as células T efectoras maduras estão presentes, as MSCs podem interagir com elas para distorcer o equilíbrio das respostas de T_H1 (via 1) para as respostas de T_H2 (via 5), e provavelmente para uma atividade de células B produtoras de IgE aumentada (via 7), resultados desejáveis para a supressão de GvHD e sintomas de doenças autoimunes. As MSCs em sua capacidade de resultar em uma geração aumentada de população de T_{Reg} (via 3) podem resultar em um fenótipo tolerante e podem auxiliar um hospedeiro receptor por enfraquecimento da inflamação circunstante em seu microambiente local. A linha tracejada (----) representa o mecanismo proposto.

A invenção agora será descrita em relação aos exemplos a seguir; é para ser entendido, entretanto, que o escopo da presente invenção não é para estar limitado por eles.

Exemplo 1

Materiais e Métodos

20 Cultura de MSCs humanas

As MSCs humanas foram cultivadas conforme descrito por Pittenger e outros, Science, Vol. 284, p. 143 (1999). Resumidamente, as amostras de medula foram coletadas da crista ilíaca de doadores anônimos após o consentimento notificado pela Poietics Technologies, Div of Cambrex Biosciences. As MSCs foram cultivadas em Meio de Eagle Modificado da Dulbecco completo-Baixo Teor de Glicose (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia) contendo 1% de solução de antibiótico-antimicrobiano (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia) e 10% de soro bovino fetal (FBS, JRH BioSciences, Lenexa, Kansas). As MSCs desenvolveram-se como uma monocamada aderente e foram removidas com tripsina/EDTA (0,05% de tripsina a 37°C por 3 minutos). Todas as MSCs usadas foram previamente caracterizadas quanto ao potencial para múltiplas linhagens e mantiveram a capacidade de diferenciar-se em

linhagens mesenquimais (condrocíticas, adipogênicas, e osteogênicas) (Pittenger, e outros, *Science*, Vol. 284, p. 143 (1999)).

Isolamento das Células dendríticas

As células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs) foram obtidas da Poietics Technologies, Div of Cambrex Biosciences (Walkersville, MD). Os precursores das células dendríticas (DCs) da linhagem monocítica (CD1c⁺) foram selecionados positivamente a partir das PBMCs, usando um método de separação magnética de 2 etapas, de acordo com Dzionek, e outros, *J. Immunol.*, Vol. 165, p. 6037 (2000). Resumidamente, as células B que expressam CD1c foram esgotadas magneticamente das células CD19⁺ usando glóbulos magnéticos, seguido por marcação da fração esgotada de células B com CD1c marcada com biotina (BDCA1⁺) e anticorpos antibiotina e sua separação da fração de células não marcadas utilizando colunas magnéticas, de acordo com as instruções do fabricante (Miltenyi Biotech, Auburn, Califórnia). Os precursores das DCs da linhagem plasmacitóide foram isolados das PBMCs por triagem imunomagnética das células revestidas com anticorpos positivamente marcadas (BDCA2⁺) (Miltenyi Biotech, Auburn, Califórnia).

Cultura de MSC-DC

Na maioria dos experimentos, as MSCs humanas e as DCs foram cultivadas em números iguais por diversos períodos de tempo e o sobrenadante da cultura de células coletado e armazenado a -80°C até avaliação adicional. Nos experimentos selecionados, as MSCs foram cultivadas com as células maduras DC1 ou DC2 (razão de MSC:DC de 1:1) por 3 dias, e então as culturas combinadas (MSCs e DCs) foram irradiadas para impedir qualquer proliferação. A seguir, as células T alogênicas, simples, purificadas de anticorpos (CD4⁺, CD45RA⁺) foram adicionadas as MSCs/DCs irradiadas e cultivadas por uns 6 dias adicionais. A fração de células não-aderentes (células T purificadas) foi então coletada das culturas, lavada duas vezes e estimulada novamente com PHA por outras 24 horas, após o que os sobrenadantes das culturas de células foram coletados e analisados quanto ao IFN- γ e IL-4 secretados por ELISA.

Isolamento das células NK

As populações purificadas de células NK foram obtidas por esgotamento das células não NK que são magneticamente marcadas com um coquetel de anticorpos monoclonais conjugados à biotina (anticorpos anti-CD3, -CD14, -CD19, -CD36 e anti-IgE), como um reagente primário, e anticorpos monoclonais antibiotina conjugados às Microcontas, como reagente de marcação secundário. As células não-NK magneticamente marcadas foram retidas nas colunas MACS (Miltenyi Biotech, Auburn, Califórnia) em um campo magnético, enquanto que as células NK atravessaram e foram coletadas.

Isolamento da população de células T_{Reg}

A população de células T_{Reg} foi isolada usando um procedimento de isolamento de 2 etapas. Primeiro, as células T que não eram CD4⁺ foram indiretamente marcadas de modo magnético com um coquetel de anticorpos marcados com biotina e microglóbulos antibiotina. As células marcadas foram então esgotadas por separação sobre uma coluna MACS (Miltenyi Biotech, Auburn, Califórnia). A seguir, as células CD4⁺CD25⁺ foram diretamente marcadas com microcontas de CD25 e isoladas por seleção positiva a partir da fração de células T CD4⁺ pré-enriquecida. As células T CD4⁺CD25⁺ magneticamente marcadas foram retidas sobre a coluna e eluíram após a remoção da coluna do campo magnético.

Para determinar se a população aumentada de CD4⁺CD25⁺ gerada na presença das MSCs era de natureza supressora, as populações de células T_{reg} CD4⁺CD25⁺ foi isolada das culturas de PBMC ou MSC+PBMC (razão de MSC para PBMC de 1:10) (cultivadas sem qualquer estimulação adicional, por 3 dias) usando um procedimento de isolamento magnético de 2 etapas. Estas células foram irradiadas para bloquear qualquer proliferação e usadas como estimuladores em uma reação de linfócitos mistos (MLR), onde os respondedores eram as PBMCs alogênicas (razão de estimulador para respondedor de 1:100) na presença de PHA (2,5 µg/ml). A cultura foi realizada por 48 horas, após o que a ³H timidina foi adicionada. A radioatividade incorporada foi contada após 24 horas.

As PBMCs foram cultivadas na ausência ou na presença das MSCs (razão de MSC para PBMC de 1:10), após o que a fração não-aderente foi coletada e imunocolorida com receptor de TNF induzido por glicocorticóide marcado com FITC, ou GTR, e CD4 marcada com PE.

5 **Geração das células T_H1/T_H2**

As células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs) foram preparadas sobre placas a 2×10^6 células/ml, por 45 min, a 37°C, para remover os monócitos. A fração não-aderente foi incubada na presença de anticorpos anti-CD3 (5 µg/ml) e anti-CD28 (1 µg/ml) ligados às placas, sob condições de T_H1 (IL-2 (4 ng/ml) + IL-12 (5 ng/ml) + anti-IL-4 (1 µg/ml)) ou T_H2 (IL-2 (4 ng/ml) + IL-4 (4 ng/ml) + anti-IFN-γ (1 µg/ml)) por 3 dias, na presença ou na ausência das MSCs. As células foram lavadas e então estimuladas novamente com PHA (2,5 µg/ml) por outras 24 ou 48 horas, após o que os níveis de IFN-γ e IL-4 foram medidos nos sobrenadantes das culturas por ELISA (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota).

Análise dos níveis de VEGF, PGE₂, e pro-MMP-1 no sobrenadante da cultura das MSCs.

Utilizando as MSCs humanas previamente caracterizadas, os níveis de Interleucina-6 (IL-6), VEGF, mediador de lipídio prostaglandina E₂ (PGE₂), e metaloproteinase de matriz 1 (pro-MMP-1) foram analisados no sobrenadante da cultura das MSCs cultivadas por 24 horas, na presença ou na ausência das PBMCs (razão de MSC para PBMC de 1:10).

Proliferação das PBMCs

As PBMCs purificadas foram preparadas por centrifugação do "leukopack" (Cambrex, Walkersville, Maryland) sobre Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Oslo, Noruega). As células separadas foram cultivadas (em triplicatas) na presença ou na ausência das MSCs (preparadas em placas 3-4 horas antes da adição das PBMCs para permitir que elas depositem), por 48 horas, na presença do mitógeno PHA (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri). Nos experimentos selecionados, as PBMCs foram suspensas novamente em meio contendo os inibidores de PGE₂ Indometacina (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri) ou NS-938 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan). A

(³H)-timidina foi adicionada (20 µl em uma cultura de 200 µl) e as células coletadas após um cultivo adicional de 24 horas usando um coletor automático. Os efeitos das MSCs ou dos bloqueadores da PGE₂ foram calculados como a porcentagem da resposta de controle (100%) na presença de PHA.

5 **RT-PCR Quantitativa**

O RNA total a partir dos precipitados celulares foi preparado usando um kit comercialmente disponível (Qiagen, Valencia, Califórnia) e de acordo com as instruções do fabricante. O DNA genômico contaminante foi removido usando o kit sem DNA (Ambion, Austin, Texas). A RT-PCR quantitativa foi efetuada sobre um sistema de detecção MJ Research Opticon (South San Francisco, Califórnia) usando o kit de RT-PCR QuantiTect SYBR Green (Qiagen, Valencia, Califórnia) com os iniciadores em concentração de 0,5 µM. As alterações relativas nos níveis de expressão nas células cultivadas sob diferentes condições foram calculadas pela diferença nos valores de Ct (ponto de cruzamento) usando a β-actina como controle interno. As seqüências para os iniciadores específicos para COX-1 e COX-2 foram: COX-1: 5'-CCG GAT GCC AGT CAG GAT GAT G-3' adiante, 5'-CTA GAC AGC CAG ATG CTG ACA G-3' anterior; COX-2: 5'-ATC TAC CCT CCT CAA GTC CC-3' adiante, 5'-TAC CAG AAG GGC AGG ATA CAG-3' anterior.

Os números crescentes de PBMCs alogênicas foram incubados com os números constantes de MSCs (2.000 células/cavidade) preparadas sobre uma placa de 96 poços, na presença de PHA (2,5 µg/ml), por 72 horas, e a incorporação de ³H timidina (contagens por minuto, cpm) foi determinada. As PBMCs e as MSCs foram cultivadas em razões de MSC:PBMC de 1:1, 1:3, 1:10, 1:30, e 1:81.

Resultados

Nos presentes estudos, examinou-se a interação das MSCs humanas com as populações isoladas de células imunes, incluindo as células dendríticas (DC1 e DC2), as células T efectoras (T_H1 e T_H2) e as células NK. A interação das MSCs com cada tipo de célula imune teve conseqüências específicas, sugerindo que as MSCs possam modular diversas etapas no processo da resposta imune. A produção de fator(es) secretado(s) que mo-

dula(m) e pode(m) ser responsável(is) pelos efeitos imunomoduladores das MSCs foi avaliada e a síntese de prostaglandina estava envolvida.

As células dendríticas precursoras mielóides (DC1) e plasmacitoides (DC2) foram isoladas por triagem imunomagnética das células BD-CA1⁺ e BDCA2⁺, respectivamente, e maturadas por incubação com GM-CSF e IL-4 (1 x 10³ IU/ml e 1 x 10³ IU/ml, respectivamente) para as células DC1, ou IL-3 (10 ng/ml) para as células DC2. Usando a citometria de fluxo, as células DC1 eram HLA-DR⁺ e CD11c⁺, enquanto as células DC2 eram HLA-DR⁺ e CD123⁺ (figura 1A). Na presença do agente inflamatório lipopolissacárido bacteriano (LPS, 1 ng/ml), as células DC1 produziram níveis moderados de TNF- α , porém, quando as MSCs estavam presentes (razões examinadas 1:1 e 1:10), houve uma redução de >50% na secreção de TNF- α (figura 1B). Por outro lado, as células DC2 produziram IL-10 na presença do LPS e seus níveis foram aumentados mais do que 2 vezes no cocultivo em MSC:DC2 (1:1) (figura 1B). Portanto, as MSCs modificaram o perfil de citocina das DCs ativadas na cultura para um fenótipo mais tolerogênico. Adicionalmente, as DCs ativadas, quando cultivadas com as MSCs, foram capazes de reduzir o IFN- γ e aumentar os níveis de IL-4 secretados pelas células T CD4⁺ simples (figura 1C), sugerindo uma mudança mediada pelas MSCs de fenótipo de célula T pró-inflamatório para anti-inflamatório.

Como a secreção aumentada de IL-10 desempenha uma função na geração de células reguladoras (Kingsley, e outros, *J. Immunol.*, Vol. 168, p. 1080 (2002)), as células T reguladoras (T_{Reg}) foram quantificadas por citometria de fluxo em coculturas de PBMCs e MSCs. Na cultura das PBMCs com as MSCs por 3-5 dias, houve um aumento nos números de células T_{Reg} conforme determinado por coloração das PBMCs com os anticorpos anti-CD4 e anti-CD25 (figura 2A), adicionalmente suportando uma resposta tolerogênica induzida por MSC. A população de células T_{Reg} CD4⁺CD25⁺, gerada na presença de MSCs, expressou níveis aumentados de receptor de TNF induzido por glicocorticóide (GITR), um receptor da superfície celular expresso sobre as populações de células T_{Reg}, e era de natureza supressora visto que ela suprimiu a proliferação de células T alogênicas (figura 3A,B). A

seguir, as MSCs foram investigadas quanto à sua capacidade direta de afetar a diferenciação das células T. Usando as células T purificadas selecionadas por anticorpos (células Th CD4⁺), as células T_H1 produtoras de IFN- γ e T_H2 produtoras de IL-4 foram geradas na presença ou na ausência das MSCs. Quando as MSCs estavam presentes durante a diferenciação, houve secreção reduzida de IFN- γ pelas células T_H1 e secreção aumentada de IL-4 pelas células T_H2 (figura 2B). Nenhuma alteração significativa nos níveis de IFN- γ e IL-4 foi vista quando as MSCs foram adicionadas à cultura após as células Th terem se diferenciado (em 3 dias) nos tipos T_H1 ou T_H2 efetores (dados não-mostrados). Estes experimentos sugerem que as MSCs podem afetar a diferenciação das células T efetoras diretamente e alterar a secreção de citocinas pelas células T para um fenótipo humoral.

Similarmente, quando as MSCs foram cultivadas com as células NK purificadas (CD3⁻, CD14⁻, CD19⁻, CD36⁻) em uma razão de 1:1 para diferentes períodos de tempo (0-48 h), houve uma secreção diminuída de IFN- γ no sobrenadante da cultura (figura 2C), com isso sugerindo que as MSCs podem modular as funções das células NK também.

Um trabalho anterior tinha indicado que as MSCs modificam as funções das células T por fator(es) solúvel(is) (LeBlanc, e outros, Exp. Hematol., Vol. 31, p. 890 (2003); Tse, e outros, Transplantation, Vol. 75, p. 389 (2003)). Observou-se que as MSCs secretaram diversos fatores, incluindo IL-6, prostaglandina E₂, VEGF e proMMP-1 constitutivamente, e os níveis de cada um aumentaram na cultura com as PBMCs (figura 5). Para investigar os fatores derivados das MSCs que resultam na inibição do TNF- α e no aumento da produção de IL-10 pelas DCs, a função potencial da prostaglandina E₂ foi investigada, visto que ela tinha sido mostrada inibir a produção de TNF- α pelas DCs ativadas (Vassiliou, e outros, Cell. Immunol., Vol. 223, p. 120 (2003)). Os meios condicionados de cultura de MSC (cultura por 24 horas de 0,5 x 10⁶ células/ml) continham aproximadamente 1000 pg/ml de PGE₂ (figura 4A). Não havia nenhuma presença detectável de indutores conhecidos da secreção de PGE₂, p.ex., TNF- α , IFN- γ ou IL-1 β (dados não-mostrados) no sobrenadante da cultura, indicando uma secreção constitutiva

de PGE₂ pelas MSCs. A secreção de PGE₂ pelas hMSCs foi inibida 60-90% na presença dos inibidores conhecidos da produção de PGE₂, NS-398 (5 µM) e indometacina (4 µM) (figura 4A). À medida que ocorre a liberação da secreção de PGE₂, como um resultado da atividade enzimática da enzima

5 cicloxigenase 1 (COX-1) constitutivamente ativa e da enzima cicloxigenase 2 (COX-2) induzível (Harris, e outros, Trends Immunol., Vol. 23, p. 144 (2002)), analisava-se a expressão do mRNA para COX-1 e COX-2 nas MSCs e PBMCs usando o sistema de cultura de transcavidades. As MSCs expressaram níveis significativamente maiores de COX-2 em comparação com as

10 PBMCs e os níveis de expressão aumentam > 3 vezes na cocultura das MSCs e PBMCs (razão de MSC para PBMC de 1:10) por 24 horas (figura 4B). Viram-se alterações modestas nos níveis de COX-1, sugerindo que o aumento na secreção de PGE₂ na cocultura de MSC-PBMC (figura 5) é mediado pela suprarregulação da COX-2. Para investigar se os efeitos imuno-

15 moduladores da MSC sobre as DCs e as células T eram mediados pela PGE₂, as MSCs foram cultivadas com as células dendríticas ativadas (DC1) ou as células T_H1, na presença dos inibidores da PGE₂ NS-398 ou indometacina. A presença de NS-398 ou indometacina aumentou a secreção de TNF-α pelas DC1s e a secreção de IFN-γ a partir das células T_H1 (figura 4C),

20 respectivamente, sugerindo que os efeitos das MSCs sobre os tipos de células imunes podem ser mediados pela PGE₂ secretada. Os estudos recentes mostraram que as MSCs inibem a proliferação de células T induzida por diversos estímulos (DeNicola, e outros, Blood, Vol. 99, p. 3838 (2002); LeBlanc, e outros, Scand. J. Immunol., Vol. 57, p. 11 (2003)). Observou-se que

25 as MSCs inibem a proliferação de células T induzida por mitógeno em um modo dependente da dose (figura 6) e, quando os inibidores da PGE₂ NS-398 (5 µM) ou indometacina (4 µM) estavam presentes, houve um aumento de >70% na incorporação da (³H) timidina pelas PBMCs tratadas com PHA nas culturas contendo MSCs, em comparação com os controles sem os ini-

30 bidores (figura 4D).

Em resumo, propõe-se um modelo de interação da MSC com outros tipos de células imunes (figura 7). Quando as células T maduras es-

tão presentes, as MSCs podem interagir com elas diretamente e inibir a produção de IFN- γ pró-inflamatório (via 1) e promover o fenótipo de células T reguladoras (via 3) e as células T_{H2} anti-inflamatórias (via 5). Ademais, as MSCs podem alterar o resultado da resposta imune da célula T através das DCs por secreção de PGE₂, inibindo as células DC1 pró-inflamatórias (via 2) e promovendo as células DC2 anti-inflamatórias (via 4) ou as DCs reguladoras (via 3). Uma mudança para a imunidade de T_{H2}, por sua vez, sugere uma mudança na atividade da célula B para a geração aumentada de anticorpos dos subtipos IgE/IgG1 (via 7). As MSCs, por sua capacidade de inibir a secreção de IFN- γ a partir das células NK, provavelmente modificam a função das células NK (via 6). Este modelo de interações entre MSCs:Células imunes está consistente com a experimentação efetuada em diversos outros laboratórios (LeBlanc, e outros, Exp. Hematol., Vol. 31, p. 890 (2003); Tse, e outros, Transplantation, Vol. 75, p. 389 (2003); DiNicola, e outros, Blood, Vol. 99, p. 3838 (2002)). O exame adicional dos mecanismos propostos está em andamento e os estudos de animais são agora necessários para examinar os efeitos *in vivo* da administração das MSCs.

Exemplo 2

As células-tronco mesenquimais foram dadas a uma paciente de 33 anos de idade, sofrendo de doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD) de Grau IV, gastrointestinal. A paciente estava resistente a todos os outros tratamentos de GVHD. Os exames endoscópicos do cólon da paciente mostraram áreas de ulceração e inflamação, antes do tratamento. A histologia do cólon da paciente mostrou que a doença do enxerto versus hospedeiro tinha destruído a grande maioria das criptas intestinais da paciente, antes do tratamento.

A paciente recebeu uma infusão intravenosa de células-tronco mesenquimais alogênicas em 50 ml de Plasma Lyte A, em uma quantidade de 3×10^6 células por quilograma de peso do corpo.

A paciente foi avaliada em duas semanas após a infusão. Nas duas semanas após a infusão, um exame endoscópico do cólon da paciente mostrou que as áreas de inflamação e ulceração, visíveis antes do tratamen-

to, estavam resolvidas. Além disso, uma biopsia do cólon da paciente mostrou uma regeneração significativa das criptas intestinais. Assim, a administração das células-tronco mesenquimais à paciente resultou em uma redução significativa no componente inflamatório da doença do enxerto versus
5 hospedeiro gastrointestinal, e resultou na regeneração de tecido intestinal funcional novo.

As descrições de todas as patentes, publicações, incluindo os pedidos de patente publicados, números de acesso do depositário, e números de acesso dos bancos de dados são, pelo presente, incorporadas por
10 referência na mesma proporção como se cada patente, publicação, número de acesso do depositário, e número de acesso do banco de dados fosse específica e individualmente incorporado por referência.

É para ser entendido, entretanto, que o escopo da presente invenção não é para estar limitado às modalidades específicas descritas acima. A invenção pode ser praticada em um modo diferente como particularmente descrito e ainda estar dentro do escopo das reivindicações que a-
15 acompanham.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de células-tronco mesenquimais, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma combinação/composição/medicamento para restaurar o dano epitelial em um animal em necessidade da mesma.
- 5 2. Uso de células-tronco mesenquimais, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma combinação/composição/medicamento para restaurar o tecido intestinal lesionado em um animal em necessidade da mesma.
- 10 3. Uso de células-tronco mesenquimais, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma combinação/composição/medicamento para restaurar o tecido intestinal ulcerado em um animal em necessidade da mesma.
- 15 4. Uso de células-tronco mesenquimais, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma combinação/composição/medicamento para regenerar o tecido intestinal em um animal em necessidade da mesma.
- 20 5. Método para restaurar o dano epitelial em um animal, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao dito animal as células-tronco mesenquimais em uma quantidade eficaz para restaurar o dito dano epitelial no dito animal.
- 25 6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o dito animal é um mamífero.
7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o dito mamífero é um ser humano.
8. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o dito dano epitelial é um resultado da doença do enxerto versus hospedeiro.
- 25 9. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o dito dano epitelial é um resultado de uma doença autoimune.
- 30 10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a dita doença autoimune é selecionada a partir do grupo que consiste essencialmente em artrite reumatóide, doença de Crohn, diabetes Tipo 1, esclerose múltipla, escleroderma, Doença de Grave, lupo, doença

inflamatória do intestino, gastrite autoimune, e doença glomerular autoimune.

11. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o dito dano epitelial compreende o tecido epitelial intestinal ulcerado.

5 12. Método para restaurar o tecido intestinal lesionado em um animal, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao dito animal as células-tronco mesenquimais em uma quantidade eficaz para restaurar o dito tecido intestinal lesionado.

10 13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o dito animal está sofrendo de doença do enxerto versus hospedeiro.

14. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o dito animal está sofrendo de uma doença autoimune.

15 15. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a dita doença autoimune é selecionada a partir do grupo que consiste essencialmente em artrite reumatóide, doença de Crohn, diabetes Tipo 1, esclerose múltipla, escleroderma, Doença de Grave, lupo, doença inflamatória do intestino, gastrite autoimune, e doença glomerular autoimune.

20 16. Método para restaurar o tecido intestinal ulcerado em um animal, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao dito animal as células-tronco mesenquimais em uma quantidade eficaz para restaurar o dito tecido intestinal ulcerado.

25 17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o dito animal está sofrendo de doença do enxerto versus hospedeiro.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a dita doença do enxerto versus hospedeiro é a doença do enxerto versus hospedeiro de Grau IV, gastrointestinal.

30 19. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o dito animal está sofrendo de uma doença autoimune.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a dita doença autoimune é selecionada a partir do grupo que

consiste essencialmente em artrite reumatóide, doença de Crohn, diabetes Tipo 1, esclerose múltipla, escleroderma, Doença de Grave, lupo, doença inflamatória do intestino, gastrite autoimune, e doença glomerular autoimune.

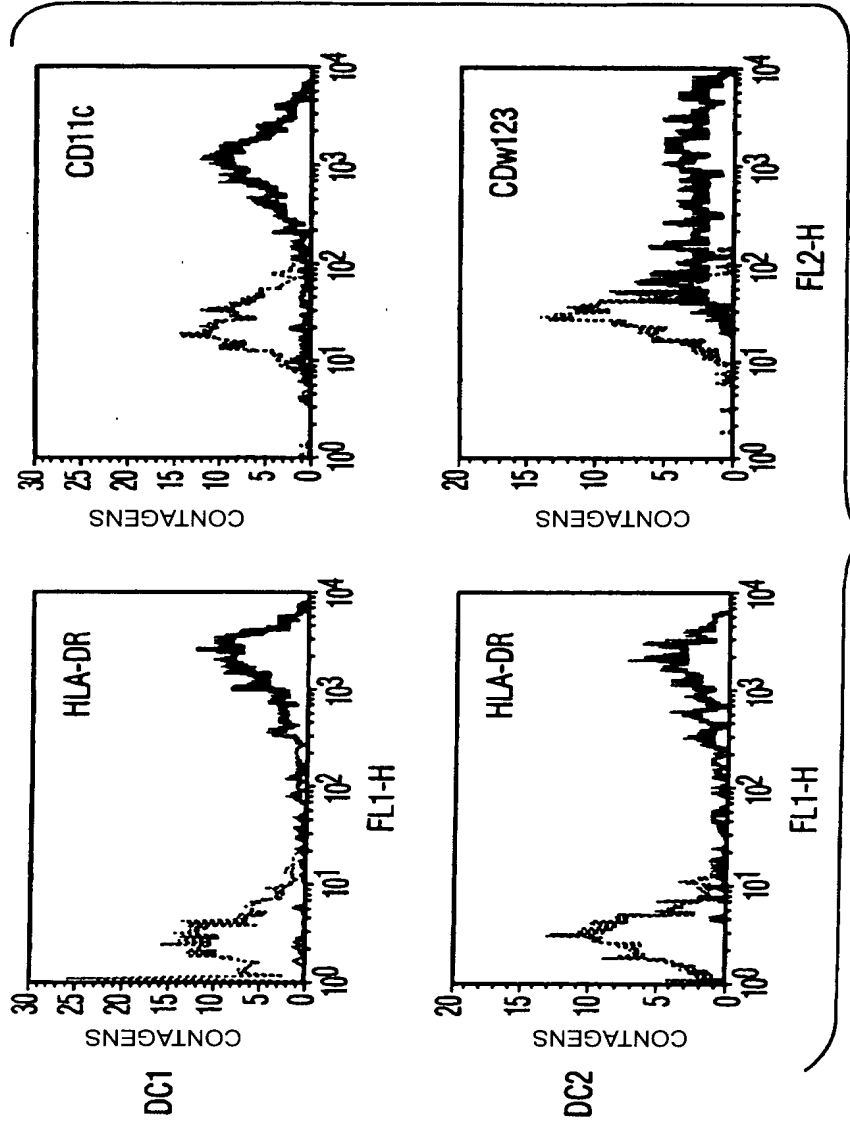
5 21. Método para regenerar o tecido intestinal em um animal, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao dito animal as células-tronco mesenquimais em uma quantidade eficaz para regenerar o dito tecido intestinal.

10 22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o dito animal está sofrendo de doença do enxerto versus hospedeiro.

23. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o dito animal está sofrendo de uma doença autoimune.

15 24. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a dita doença autoimune é selecionada a partir do grupo que consiste essencialmente em artrite reumatóide, doença de Crohn, diabetes Tipo 1, esclerose múltipla, escleroderma, Doença de Grave, lupo, doença inflamatória do intestino, gastrite autoimune, e doença glomerular autoimune.

20 25. Invenção em todas as suas concretizações e realizações, caracterizada pelo fato de que é como descrita no relatório descritivo do presente pedido de patente, particularmente nos Exemplos ilustrativos, em todas as formas ou classes de reivindicações aplicáveis.



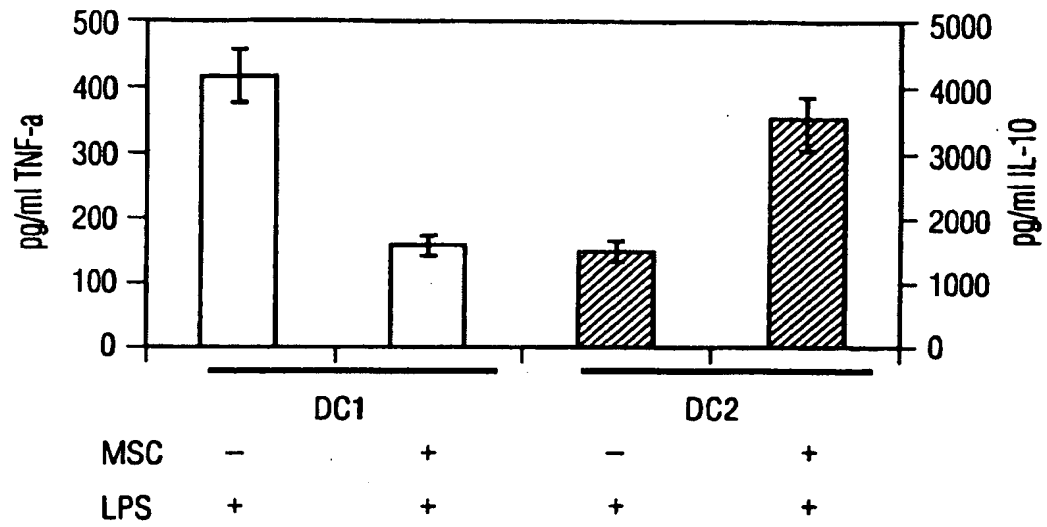


FIG. 1B

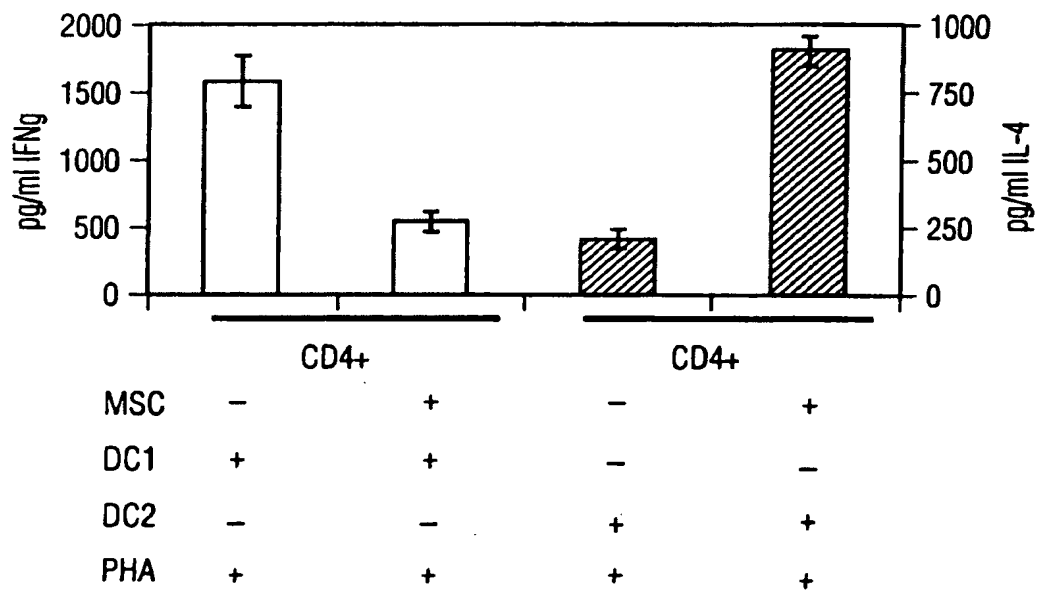
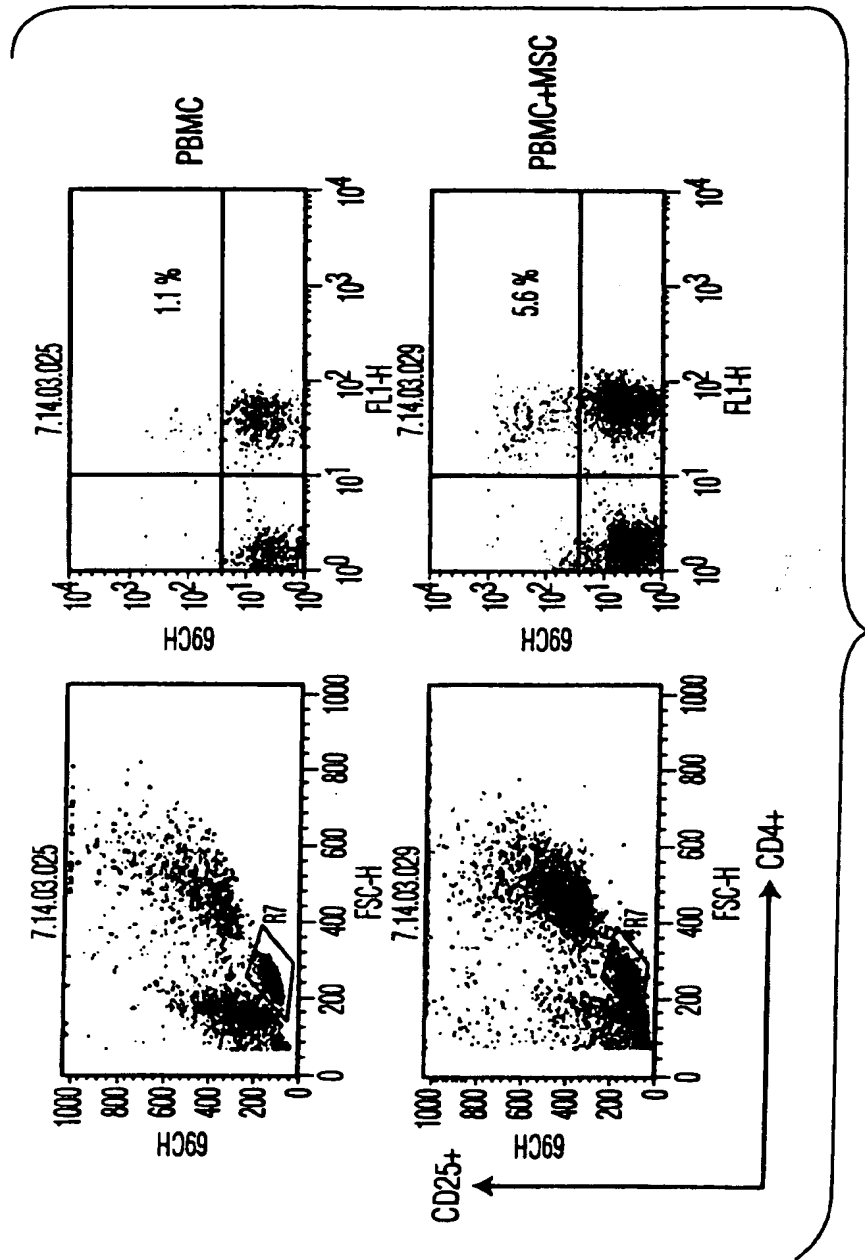


FIG. 1C



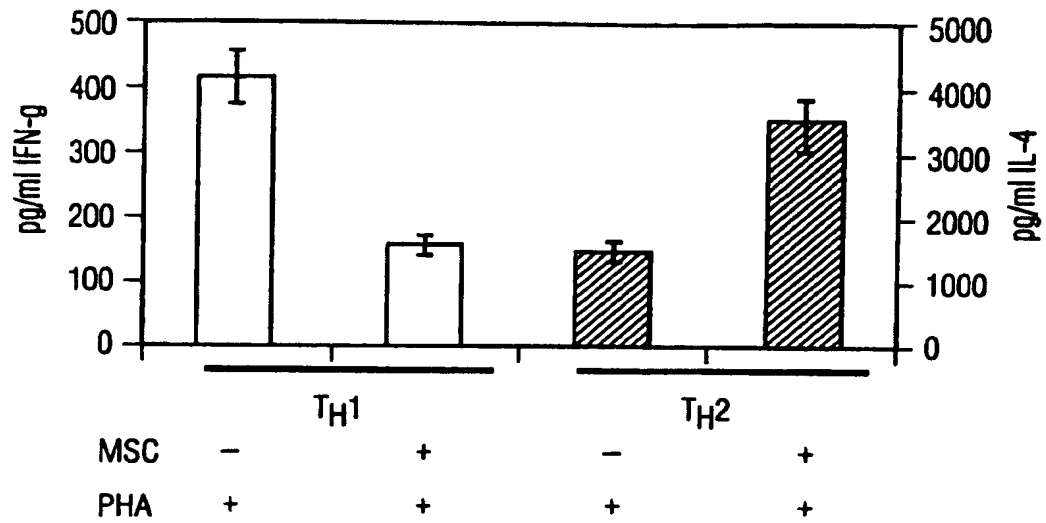


FIG. 2B

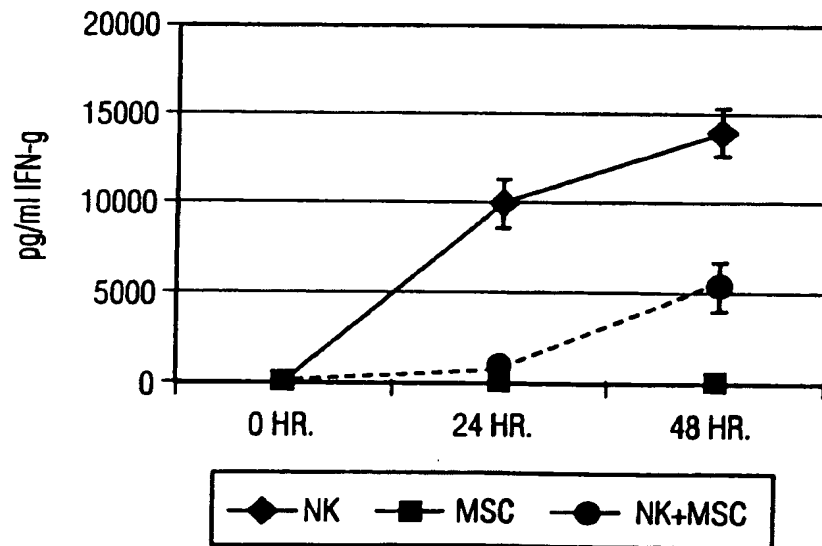


FIG. 2C

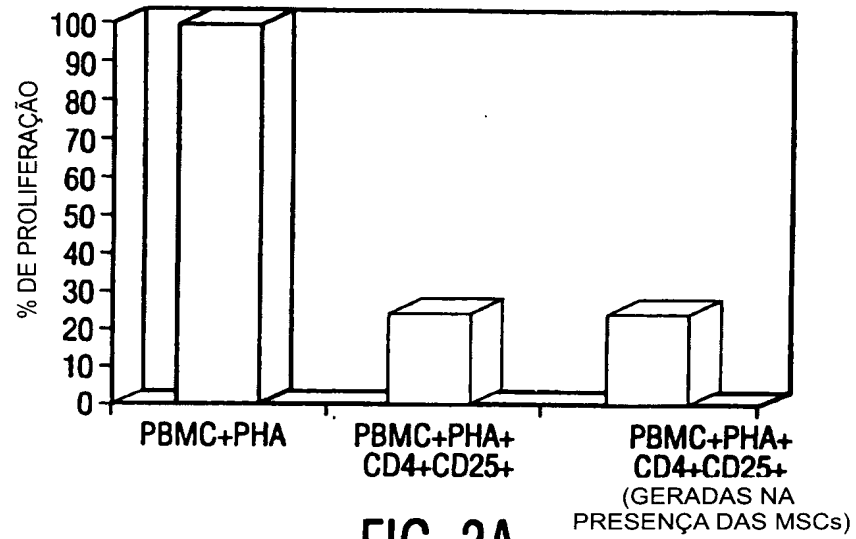


FIG. 3A

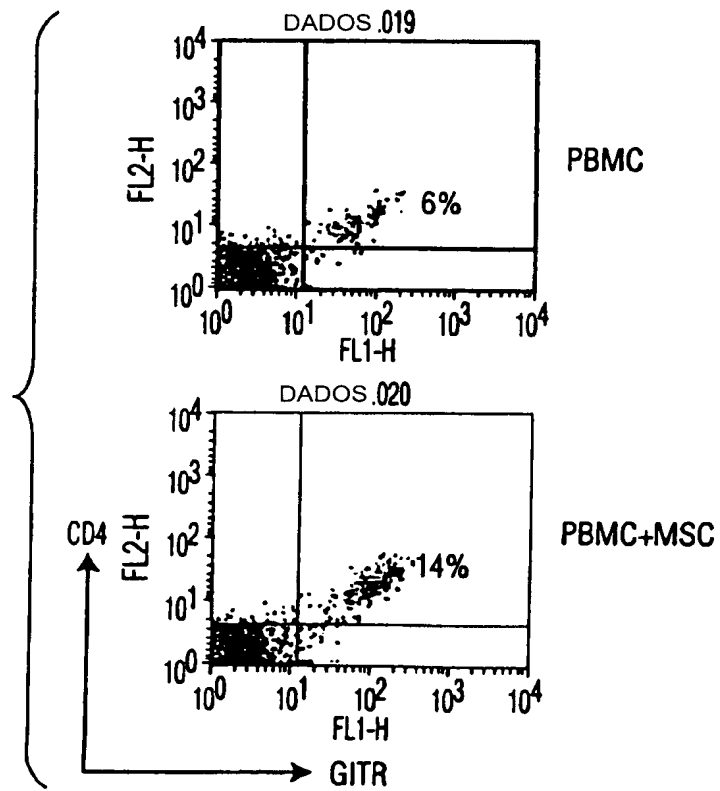


FIG. 3B

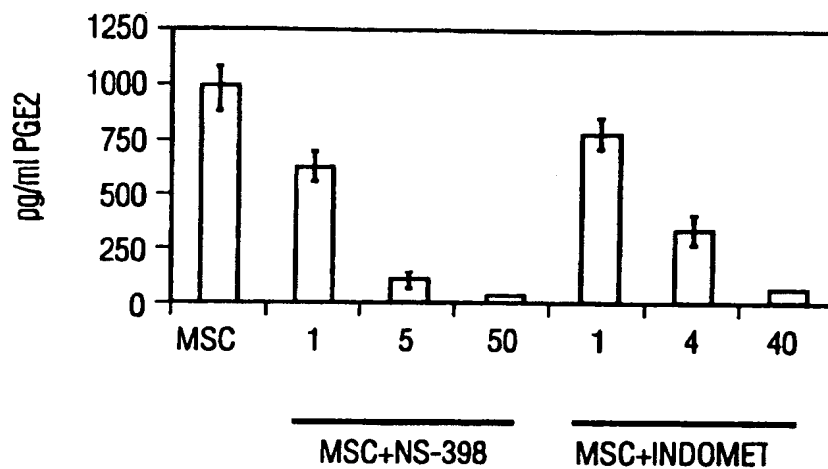


FIG. 4A

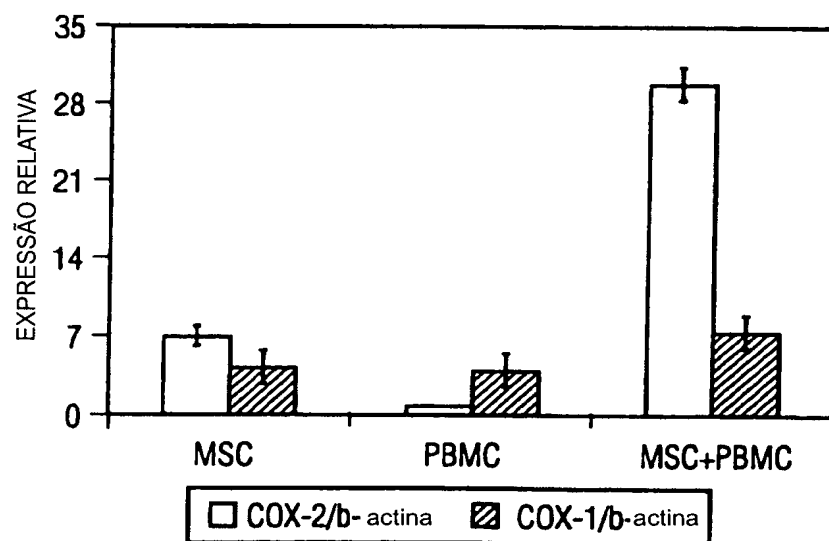


FIG. 4B

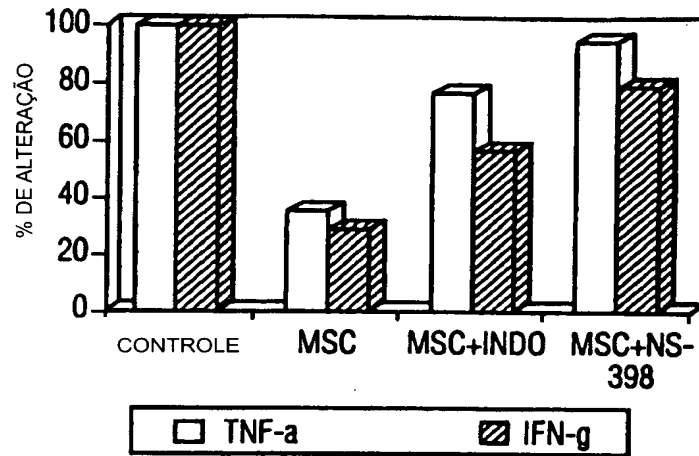


FIG. 4C

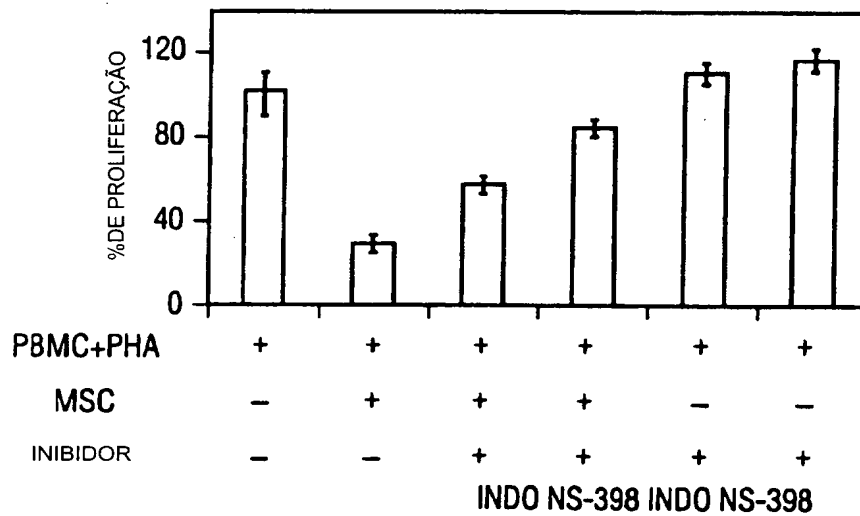


FIG. 4D

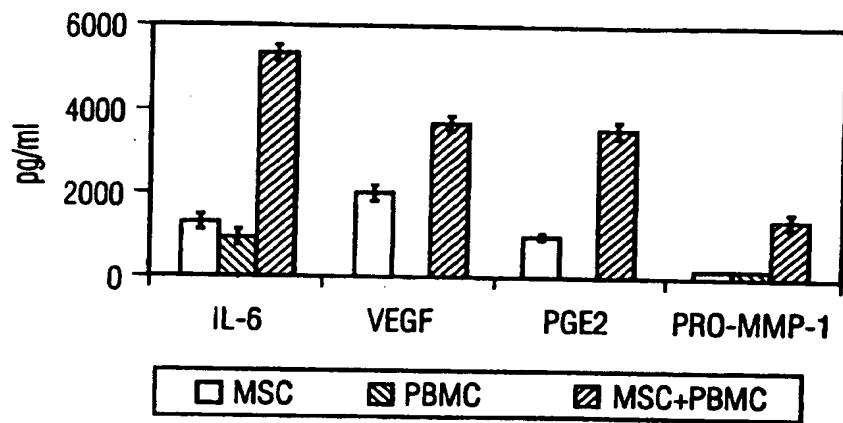


FIG. 5

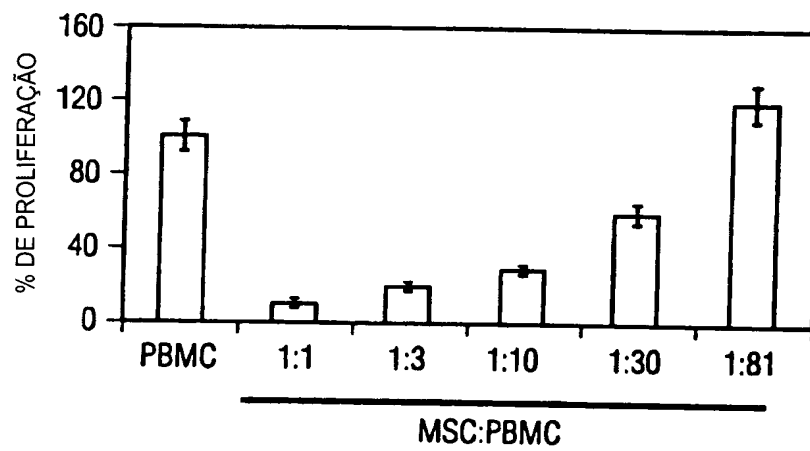


FIG. 6

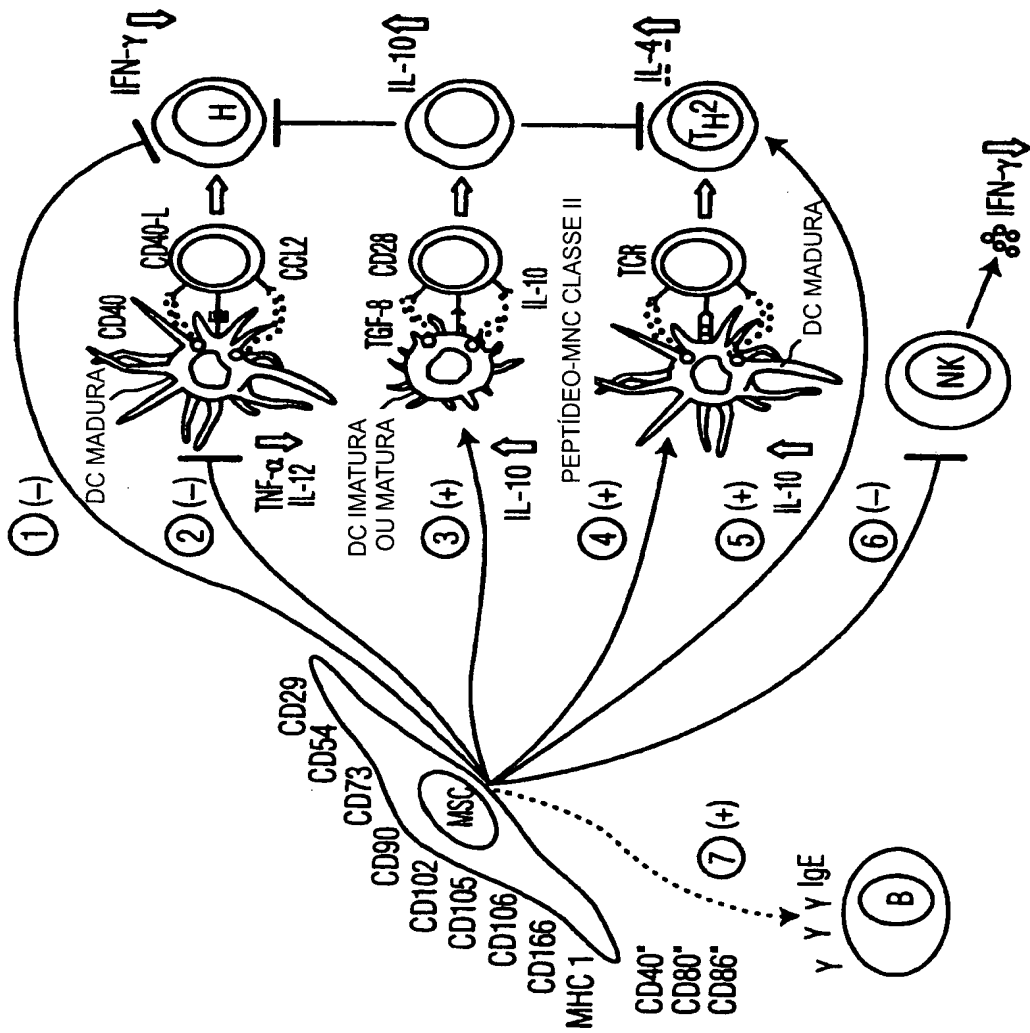


FIG. 7

RESUMO

Patente de Invenção: **"USOS DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS"**.

5 A presente invenção refere-se a métodos de tratar doenças autoimunes, respostas alérgicas, câncer, ou doenças inflamatórias em um animal, promover a cicatrização da ferida, restaurar o dano epitelial e promover a angiogênese em um órgão ou tecido de um animal, por administração ao animal de células-tronco mesenquimais em uma quantidade eficaz.