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

(21) BR 112021010245-0 A2

(22) Data do Depósito: 29/11/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 17/08/2021

(54) Título: EXPANSÃO DE CÉLULAS NATURAL KILLER E CÉLULAS ILC3 COM NOVOS COMPOSTOS AROMÁTICOS

(51) Int. Cl.: C12N 5/0783.

(30) Prioridade Unionista: 30/11/2018 US 62/774,114.

(71) Depositante(es): CELULARITY INC..

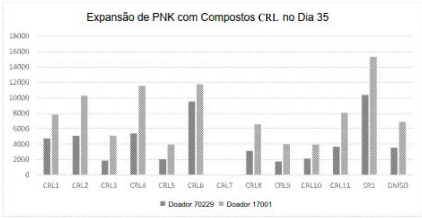
(72) Inventor(es): ROBERT J. HARIRI; XIAOKUI ZHANG; LIN KANG; WILLIAM VAN DER TOUW; VANESSA VOSKINARIAN-BERSE; XUAN GUO.

(86) Pedido PCT: PCT US2019063876 de 29/11/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/113182 de 04/06/2020

(85) Data da Fase Nacional: 26/05/2021

(57) Resumo: EXPANSÃO DE CÉLULAS NATURAL KILLER E CÉLULAS ILC3 COM NOVOS COMPOSTOS AROMÁTICOS. São fornecidos neste documento métodos de produção de células natural killer (NK) e / ou células ILC3 usando um método de expansão e diferenciação de três estágios com meios compreendendo fatores de mobilização de células-tronco. Também são fornecidos neste documento métodos de suprimir a proliferação de células tumorais usando as células NK e / ou células ILC3 e as populações de células NK e / ou células ILC3 produzidas pelos métodos de três estágios descritos neste documento, bem como métodos de tratamento de indivíduos com câncer ou uma infecção viral, compreendendo a administração das células NK e / ou células ILC3 e as populações de células NK e / ou células ILC3 produzidas pelos métodos de três estágios descritos neste documento a um indivíduo com câncer ou infecção viral.



EXPANSÃO DE CÉLULAS *NATURAL KILLER* E CÉLULAS ILC3 COM NOVOS COMPOSTOS AROMÁTICOS

1. CAMPO

[001] São fornecidos aqui métodos de produção de populações de células exterminadoras naturais (NK) e/ou células ILC3 a partir de uma população de células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras em meios compreendendo fatores de mobilização de células-tronco, *por exemplo*, métodos de três estágios de produção de células NK e/ou células ILC3 em meios que compreendem fatores de mobilização de células-tronco começando com células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras de células da placenta, por exemplo, de perfusato placentário (*por exemplo*, perfusato placentário humano) ou outros tecidos, por exemplo, sangue do cordão umbilical ou sangue periférico. Além disso, são fornecidos aqui métodos de utilização do perfusato placentário, das células NK e/ou células ILC3 e/ou células progenitoras NK aqui descritas, para, *por exemplo*, suprimir a proliferação de células tumorais ou para inibir a infecção por patógenos, *por exemplo*, infecção viral. Em certas modalidades, as células NK e/ou células ILC3 e/ou células progenitoras NK produzidas pelos métodos de três estágios aqui descritos são usadas em combinação com e/ou tratadas com um ou mais compostos imunomoduladores.

2. FUNDAMENTO DA INVENÇÃO

[002] As células exterminadoras naturais (NK) são linfócitos citotóxicos que constituem o principal componente do sistema imunológico inato.

[003] As células NK são ativadas em resposta a interferons ou citocinas derivadas de macrófagos. A atividade citotóxica das células NK é amplamente regulada por dois tipos de receptores de superfície, que podem ser considerados "receptores ativadores" ou "receptores inibitórios", embora alguns receptores, *por exemplo*, CD94 e 2B4 (CD244), possam funcionar de qualquer maneira

dependendo do ligante interações.

[004] Entre outras atividades, as células NK desempenham um papel na rejeição de tumores pelo hospedeiro e têm se mostrado capazes de matar células infectadas por vírus. As células exterminadoras naturais podem ser ativadas por células que não possuem ou exibem níveis reduzidos de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). As células cancerosas com nível alterado ou reduzido de expressão de MHC de classe I resultam na indução da sensibilidade das células NK. As células NK ativadas e expandidas e, em alguns casos, as células LAK de sangue periférico têm sido usadas em terapia *ex vivo* e tratamento *in vivo* de pacientes com câncer avançado, com algum sucesso contra doenças relacionadas à medula óssea, como leucemia; câncer de mama; e certos tipos de linfoma.

[005] Apesar das propriedades vantajosas das células NK em matar células tumorais e células infectadas por vírus, permanece uma necessidade na técnica de desenvolver métodos eficientes para produzir e expandir células exterminadoras naturais que retêm funções tumoricidas.

[006] As células NK são células linfoides inatas (ILCs). As células linfoides inatas estão relacionadas por meio de sua dependência do fator de transcrição ID2 para o desenvolvimento. Um tipo de ILC, conhecido como célula ILC3, é descrito na literatura como expressando RORγt e produzindo IL-22, além de atuar na resposta imune de adultos, sem manifestar efetores citotóxicos como perforina, granzimas e morte receptores (Montaldo *et al.*, 2014, *Immunity* 41:988-1000; Killig *et al.*, 2014, *Front. Immunol.* 5:142; Withers *et al.*, 2012, *J. Immunol.* 189(5):2094-2098).

3. SUMÁRIO

[007] São fornecidos aqui métodos de expansão e diferenciação de células, por exemplo, células hematopoiéticas, como células-tronco hematopoiéticas,

por exemplo, células-tronco hematopoiéticas $CD34^+$, para produzir células exterminadoras naturais (NK) e/ou células ILC3. Em particular, a presente invenção se concentra em novos compostos aromáticos (agentes/fatores mobilizadores de células-tronco) que promovem a proliferação/expansão de células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras, a fim de produzir populações aumentadas de células NK e/ou ILC3 diferenciadas das referidas células progenitoras hematopoiéticas. Estes compostos, e sua síntese e validação, são descritos em maiores detalhes no pedido codepositado No. ___, que está incorporado aqui por referência.

[008] Em um aspecto, são fornecidos aqui métodos de produção de populações de células NK e/ou populações de células ILC3 que compreendem três estágios, conforme descrito neste documento (e referido aqui como o "método de três estágios"). Células exterminadoras naturais e/ou células ILC3 produzidas pelos métodos de três estágios aqui fornecidos são referidas aqui como "células NK produzidas pelo método de três estágios", "células ILC3 produzidas pelo método de três estágios" ou "células NK e/ou células ILC3 produzidas pelo método de três estágios.” Em certas modalidades, o referido método compreende uma ou mais etapas adicionais ou intermediárias. Em certas modalidades, o referido método não compreende nenhuma quarta etapa ou etapa intermediária na qual as células são colocadas em contato (por exemplo, cultivadas).

[009] Em um aspecto, é fornecido aqui um método de produção de células NK compreendendo a cultura de células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras, *por exemplo*, células-tronco $CD34^+$ ou células progenitoras, em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células, subsequentemente cultivando a referida primeira população de células em um

segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células e, subsequentemente, cultivando a referida segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem um agente de mobilização de células-tronco e (opcionalmente) heparina de baixo peso molecular (LMWH), para produzir uma terceira população de células, em que a terceira população de células compreende células exterminadoras que são CD56 +, CD3-, e em que pelo menos 70%, por exemplo 80%, das células exterminadoras naturais são viáveis. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular. Em certas modalidades, essas células exterminadoras naturais compreendem células exterminadoras naturais que são CD16-. Em certas modalidades, essas células exterminadoras naturais compreendem células exterminadoras naturais que são CD94+. Em certas modalidades, essas células exterminadoras naturais compreendem células exterminadoras naturais que são CD94+ ou CD16+. Em certas modalidades, essas células exterminadoras naturais compreendem células exterminadoras naturais que são CD94- ou CD16-. Em certas modalidades, essas células exterminadoras naturais compreendem células exterminadoras naturais que são CD94+ e CD16+. Em certas modalidades, essas células exterminadoras naturais compreendem células exterminadoras naturais que são CD94- e CD16-. Em

certas modalidades, pelo menos um, dois ou todos os três do referido primeiro meio, segundo meio e terceiro meio não são o meio GBGM®. Em certas modalidades, o terceiro meio não tem glicosaminoglicanas dessulfatadas adicionadas. Em certas modalidades, o terceiro meio não tem glicosaminoglicanas dessulfatadas.

[010] Em um aspecto, é fornecido aqui um método de produção de células NK compreendendo (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem LMWH, para produzir uma terceira população de células; em que a terceira população de células compreende células exterminadoras naturais que são CD56+, CD3- e CD11a+. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[011] Em um aspecto, é fornecido aqui um método de produção de células NK compreendendo (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-

tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem cada fator de células-tronco (SCF) e LMWH, para produzir uma terceira população de células; em que a terceira população de células compreende células exterminadoras naturais que são CD56+, CD3- e CD11a+. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[012] Em um aspecto, é fornecido aqui um método de produção de células NK compreendendo (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e que não tem SCF, um agente de mobilização de célula-tronco, e LMWH, para produzir uma terceira população de células; em que a terceira população de células compreende células exterminadoras naturais que são CD56 +, CD3- e

CD11a. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[013] Em um aspecto, é fornecido aqui um método de produção de células NK compreendendo (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e que não tem cada de um agente de mobilização de célula-tronco, e LMWH, para produzir uma terceira população de células; e (d) isolar células CD11a+ da terceira população de células; em que a quarta população de células compreende células exterminadoras naturais que são CD56 +, CD3- e CD11a. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em

certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[014] Em certas modalidades, as referidas células exterminadoras naturais expressam perforina e eomesodermina (EOMES). Em certas modalidades, as referidas células exterminadoras naturais não expressam o receptor órfão gama relacionado a RAR (RORγt) ou o receptor 1 de interleucina-1 (IL1R1).

[015] Em um aspecto, é fornecido aqui um método de produção de células ILC3 compreendendo (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem LMWH, para produzir uma terceira população de células; em que a terceira população de células compreende células ILC3 que são CD56+, CD3- e CD11a+. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[016] Em um aspecto, é fornecido aqui um método de produção de células ILC3 compreendendo (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou

progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo um agente de mobilização de célula-tronco, IL-2 e IL-15, e sem LMWH, para produzir uma terceira população de células; em que a terceira população de células compreende células ILC3 que são CD56+, CD3- e CD11a-. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[017] Em um aspecto, é fornecido aqui um método de produção de células ILC3 compreendendo (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem LMWH, para produzir uma terceira população de células; em que a terceira população de células compreende células ILC3 que são CD56+, CD3- e

CD11a+. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[018] Em um aspecto, é fornecido aqui um método de produção de células ILC3 compreendendo (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo um agente de mobilização de célula-tronco, IL-2 e IL-15, e sem LMWH, para produzir uma terceira população de células; em que a terceira população de células compreende células ILC3 que são CD56+, CD3- e CD11a-. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio

compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[019] Em um aspecto, é fornecido aqui um método de produção de células ILC3 compreendendo (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e que não tem cada de um agente de mobilização de célula-tronco, e LMWH, para produzir uma terceira população de células; e (d) isolar células CD11a- da terceira população de células; em que a quarta população de células compreende células ILC3 que são CD56 +, CD3- e CD11a-. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[020] Em certas modalidades, as referidas células ILC3 expressam RORγt e IL1R1. Em certas modalidades, as referidas células ILC3 não expressam perforina ou EOMES. Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem glicosaminoglicanas dessulfatadas adicionadas. Em certas modalidades, referido o terceiro meio não tem glicosaminoglicanas dessulfatadas.

[021] Em certas modalidades, as referidas células-tronco hematopoiéticas

ou progenitoras são células de mamíferos.

[022] Em modalidades específicas, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são células humanas. Em modalidades específicas, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras são células de primatas. Em modalidades específicas, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são células caninas. Em modalidades específicas, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras são células de roedores. Em modalidades específicas, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são células de um mamífero diferente de um ser humano, primata, canino ou roedor.

[023] Em certos aspectos, as células-tronco hematopoéticas ou células progenitoras cultivadas no primeiro meio são células-tronco $CD34^+$ ou células progenitoras. Em certos aspectos, as células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras são células-tronco hematopoiéticas da placenta ou células progenitoras. Em certos aspectos, as células-tronco hematopoiéticas da placenta ou células progenitoras são obtidas ou podem ser obtidas do perfusato placentário (*por exemplo*, obtidas ou obteníveis a partir de células nucleadas isoladas do perfusato placentário). Em certos aspectos, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são obtidas ou podem ser obtidas a partir do sangue do cordão umbilical. Em certos aspectos, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são células do fígado fetal. Em certos aspectos, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são células sanguíneas periféricas mobilizadas. Em certos aspectos, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são células da medula óssea.

[024] Em certos aspectos, o referido primeiro meio usado no método de três estágios compreende um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo). Em certos aspectos, o primeiro meio usado no método de

três estágios compreende, além de um agente de mobilização de células-tronco e Tpo, um ou mais de Heparina de Baixo Peso Molecular (LMWH), Ligante Flt-3 (Flt-3L), fator de célula-tronco (SCF), IL-6, IL-7, fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) ou fator estimulador de granulócitos-macrófagos (GM-CSF). Em certos aspectos, o referido primeiro meio não compreende LMWH adicionado. Em certos aspectos, o referido primeiro meio não compreende glicosaminoglicanas dessulfatadas adicionadas. Em certos aspectos, o referido primeiro meio não compreende LMWH. Em certos aspectos, o referido primeiro meio não compreende glicosaminoglicanas dessulfatadas. Em certos aspectos, o primeiro meio usado no método de três estágios compreende, além de um agente de mobilização de células-tronco e Tpo, cada um de, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF e GM -CSF. Em certos aspectos, o primeiro meio usado no método de três estágios compreende, além de um agente de mobilização de células-tronco e Tpo, cada um de Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF e GM- CSF. Em certos aspectos, o referido Tpo está presente no primeiro meio a uma concentração de 1 ng/mL a 100 ng/mL, de 1 ng/mL a 50 ng/mL, de 20 ng/mL a 30 ng/mL, ou cerca de 25 ng/mL. Em certos aspectos, quando LMWH está presente no primeiro meio, o LMWH está presente em uma concentração de 1U/mL a 10U/mL; o Flt-3L está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,01 ng/mL a 0,1 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,01 ng/mL a 0,50 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,1 ng/mL. Em certos aspectos, no primeiro meio, o Flt-3L está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,01 ng/mL a 0,1 ng/mL; a IL-7 está presente em uma

concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,01 ng/mL a 0,50 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,1 ng/mL. Em certos aspectos, quando LMWH está presente no primeiro meio, o LMWH está presente em uma concentração de 4U/mL a 5U/ mL; o Flt-3L está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,04 ng/mL a 0,06 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,20 ng/mL a 0,30 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,5 ng/mL. Em certos aspectos, no primeiro meio, o Flt-3L está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,04 ng/mL a 0,06 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,20 ng/mL a 0,30 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,5 ng/mL. Em certos aspectos, quando LMWH está presente no primeiro meio, o LMWH está presente em uma concentração de cerca de 4,5U/mL; o Flt-3L está presente em uma concentração de cerca de 25 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de cerca de 27 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de cerca de 0,05 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de cerca de 25 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de cerca de.25 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de cerca de 0,01 ng/mL. Em certos aspectos, no primeiro meio, o Flt-3L está presente a uma concentração de cerca de 25 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de cerca de 27 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de cerca de 0,05 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de cerca de 25 ng/mL; o G-CSF está presente em uma

concentração de cerca de.25 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de cerca de 0,01 ng/mL. Em certas modalidades, o referido primeiro meio não é GBGM®.

[025] Em certos aspectos, o referido segundo meio usado no método de três estágios compreende um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15) e não tem Tpo. Em certos aspectos, o segundo meio usado no método de três estágios compreende, além de um agente de mobilização de células-tronco e IL-15, um ou mais de LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G -CSF e GM-CSF. Em certos aspectos, o segundo meio não compreende LMWH adicionado. Em certos aspectos, o segundo meio não compreende glicosaminoglicanas dessulfatadas adicionadas. Em certos aspectos, o segundo meio não compreende LMWH. Em certos aspectos, o segundo meio não compreende glicosaminoglicanas dessulfatadas. Em certos aspectos, o segundo meio usado no método de três estágios compreende, além de um agente de mobilização de células-tronco e IL-15, cada um de IL-6, IL-7, G -CSF e GM-CSF. Em certos aspectos, o segundo meio usado no método de três estágios compreende, além de um agente de mobilização de células-tronco e IL-15, cada um de Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G -CSF e GM-CSF. Em certos aspectos, a referida IL-15 está presente no referido segundo meio a uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL, de 10 ng/mL a 30 ng/mL ou cerca de 20 ng/mL. Em certos aspectos, quando LMWH está presente no referido segundo meio, o LMWH está presente em uma concentração de 1U/mL a 10U/mL; o Flt-3L está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,01 ng/mL a 0,1 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,01 ng/mL a 0,50 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,1 ng/mL. Em certos aspectos,

quando LMWH está presente no segundo meio, o LMWH está presente no segundo meio a uma concentração de 4U/mL a 5U/ mL; o Flt-3L está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,04 ng/mL a 0,06 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,20 ng/mL a 0,30 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,5 ng/mL. Em certos aspectos, no segundo meio, o Flt-3L está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,04 ng/mL a 0,06 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,20 ng/mL a 0,30 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,5 ng/mL. Em certos aspectos, quando LMWH está presente no segundo meio, o LMWH está presente no segundo meio a uma concentração de 4U/mL a 5U/ mL; o Flt-3L está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,04 ng/mL a 0,06 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,20 ng/mL a 0,30 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,5 ng/mL. Em certos aspectos, no segundo meio, o Flt-3L está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,04 ng/mL a 0,06 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,20 ng/mL a 0,30 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,5 ng/mL. Em certos aspectos,

quando LMWH está presente no segundo meio, o LMWH está presente no segundo meio em uma concentração de cerca de 4,5U/mL; o Flt-3L está presente em uma concentração de cerca de 25 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de cerca de 27 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de cerca de 0,05 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de cerca de 25 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de cerca de 0,25 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de cerca de 0,01 ng/mL. Em certos aspectos, no segundo meio, o Flt-3L está presente a uma concentração de cerca de 25 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de cerca de 27 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de cerca de 0,05 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de cerca de 25 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de cerca de 0,25 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de cerca de 0,01 ng/mL. Em certas modalidades, o referido segundo meio não é GBGM®.

[026] Em certos aspectos, o fator de mobilização de células-tronco é um composto com a Fórmula (I), (I-A), (I-B), (I-C) ou (I-D), conforme descrito abaixo.

[027] Em certos aspectos, o referido terceiro meio usado no método de três estágios compreende IL-2 e IL-15 e não possui um agente de mobilização de células-tronco e LMWH. Em certos aspectos, o terceiro meio usado no método de três estágios compreende, além de IL-2 e IL-15, um ou mais de SCF, IL-6, IL-7, G-CSF ou GM-CSF. Em certos aspectos, o terceiro meio usado no método de três estágios compreende, além de IL-2 e IL-15, cada um de SCF, IL-6, IL-7, G-CSF e GM-CSF. Em certos aspectos, a referida IL-2 está presente no referido terceiro meio a uma concentração de 10 U/mL a 10.000 U/mL e a referida IL-15 está presente no referido terceiro meio a uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL. Em certos aspectos, a referida IL-2 está presente no referido terceiro meio a uma concentração de 100 U/mL a 10.000 U/mL e a referida IL-15 está presente no

referido terceiro meio a uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL. Em certos aspectos, a referida IL-2 está presente no referido terceiro meio a uma concentração de 300 U/mL a 3.000 U/mL e a referida IL-15 está presente no referido terceiro meio a uma concentração de 10 ng/mL a 30 ng/mL. Em certos aspectos, a referida IL-2 está presente no referido terceiro meio a uma concentração de cerca de 1.000 U/mL e a referida IL-15 está presente no referido terceiro meio a uma concentração de cerca de 20 ng/mL. Em certos aspectos, no referido terceiro meio, o SCF está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,01 ng/mL a 0,1 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,01 ng/mL a 0,50 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,1 ng/mL. Em certos aspectos, no referido terceiro meio, o SCF está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,04 ng/mL a 0,06 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,20 ng/mL a 0,30 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,5 ng/mL. Em certos aspectos, no referido terceiro meio, o SCF está presente em uma concentração de cerca de 22 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de cerca de 0,05 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de cerca de 20 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de cerca de 0,25 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de cerca de 0,01 ng/mL. Em certas modalidades, o referido terceiro meio não é GBGM®.

[028] Em certos aspectos, o terceiro meio compreende 100 ng/mL IL-7, 1.000 ng/mL IL-2, 20 ng/mL IL-15 e agente de mobilização de células-tronco e não tem SCF. Em certos aspectos, o terceiro meio compreende 20 ng/mL IL-7, 1.000 ng/mL IL-2, 20 ng/mL IL-15 e agente de mobilização de células-tronco e

não tem SCF. Em certos aspectos, o terceiro meio compreende 20 ng/mL de IL-7, 20 ng/mL de IL-15 e agente de mobilização de células-tronco, agente de mobilização de células-tronco e não tem SCF. Em certos aspectos, o terceiro meio compreende 100 ng/mL IL-7, 22 ng/mL SCF, 1.000 ng/mL IL-2 e 20 ng/mL IL-15 e não tem agente de mobilização de células-tronco. Em certos aspectos, o terceiro meio compreende 22 ng/mL de SCF, 1.000 ng/mL de IL-2 e 20 ng/mL de IL-15 e não tem agente de mobilização de células-tronco. Em certos aspectos, o terceiro meio compreende 20 ng/mL IL-7, 22 ng/mL SCF, 1.000 ng/mL IL-2 e 20 ng/mL IL-15 e não tem agente de mobilização de células-tronco. Em certos aspectos, o terceiro meio compreende 20 ng/mL de IL-7, 22 ng/mL de SCF e 1.000 ng/mL de IL-2 e não tem agente de mobilização de células-tronco.

[029] Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não tem fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[030] Geralmente, os componentes do meio particularmente citados não se referem a possíveis constituintes em um componente indefinido do referido meio, por exemplo, soro. Por exemplo, o referido Tpo, IL-2 e IL-15 não estão incluídos em um componente indefinido do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio, *por exemplo*, o referido Tpo, IL-2 e IL-15 não estão incluídos no soro. Além disso, o referido LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF e/ou GM-CSF não estão compreendidos dentro de um componente indefinido do primeiro meio,

segundo meio ou terceiro meio, *por exemplo*, o referido LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF e/ou GM-CSF não estão incluídos no soro.

[031] Em certos aspectos, o referido primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende soro AB humano. Em certos aspectos, qualquer um do referido primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende 1% a 20% de soro-AB humano, 5% a 15% de soro-AB humano ou cerca de 2, 5 ou 10% de soro-AB humano.

[032] Em certos aspectos, qualquer um dos referidos primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende 2-mercaptoetanol. Em certos aspectos, qualquer um dos referidos primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende gentamicina.

[033] Em certas modalidades, nos métodos de três estágios descritos neste documento, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são cultivadas no referido primeiro meio para 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 dias antes da referida cultura no referido segundo meio. Em certas modalidades, as células são cultivadas no referido segundo meio por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 dias antes da referida cultura no referido terceiro meio. Em certas modalidades, as células são cultivadas no referido terceiro meio por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 dias, ou por mais de 30 dias.

[034] Em uma modalidade, nos métodos de três estágios descritos neste documento, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são cultivadas no referido primeiro meio por 7-13 dias para produzir uma primeira população de células; a referida primeira população de células é cultivada no referido segundo meio durante 2-6 dias para produzir uma segunda população de células; e a referida segunda população de células é cultivada no referido

terceiro meio durante 10-30 dias, isto é, as células são cultivadas em um total de 19-49 dias.

[035] Em uma modalidade, nos métodos de três estágios descritos neste documento, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são cultivadas no referido primeiro meio durante 8-12 dias para produzir uma primeira população de células; a referida primeira população de células é cultivada no referido segundo meio durante 3-5 dias para produzir uma segunda população de células; e a referida segunda população de células é cultivada no referido terceiro meio durante 15-25 dias, isto é, as células são cultivadas em um total de 26-42 dias.

[036] Em uma modalidade específica, nos métodos de três estágios descritos neste documento, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são cultivadas no referido primeiro meio por cerca de 10 dias para produzir uma primeira população de células; a referida primeira população de células é cultivada no referido segundo meio por cerca de 4 dias para produzir uma segunda população de células; e a referida segunda população de células é cultivada no referido terceiro meio por cerca de 21 dias, isto é, as células são cultivadas em um total de cerca de 35 dias.

[037] Em certos aspectos, a referida cultura no referido primeiro meio, segundo meio e terceiro meio são todos realizados em condições de cultura estáticas, por exemplo, em um disco de cultura ou frasco de cultura. Em certos aspectos, a referida cultura em pelo menos um dentre o referido primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio é realizada em um frasco giratório. Em certos aspectos, a referida cultura no referido primeiro meio e no referido segundo meio é realizada sob condições de cultura estáticas, e a referida cultura no referido terceiro meio é realizada em um frasco giratório.

[038] Em certos aspectos, a referida cultura é realizada em um frasco

giratório. Em outros aspectos, a referida cultura é realizada em um dispositivo G-Rex. Em ainda outros aspectos, a referida cultura é realizada em um biorreator WAVE.

[039] Em certos aspectos, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são inicialmente inoculadas no referido primeiro meio de 1 x 10^4 a 1 x 10^5 células/mL. Em um aspecto específico, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são inicialmente inoculadas no referido primeiro meio a cerca de 3 x 10^4 células/mL.

[040] Em certos aspectos, a referida primeira população de células é inicialmente inoculada no referido segundo meio de 5 x 10^4 a 5 x 10^5 células/mL. Em um aspecto específico, a referida primeira população de células é inicialmente inoculada no referido segundo meio a cerca de 1 x 10^5 células/mL.

[041] Em certos aspectos, a referida segunda população de células é inicialmente inoculada no referido terceiro meio de 1 x 10^5 a 5 x 10^6 células/mL. Em certos aspectos, a referida segunda população de células é inicialmente inoculada no referido terceiro meio de 1 x 10^5 a 1 x 10^6 células/mL. Em um aspecto específico, a referida segunda população de células é inicialmente inoculada no referido terceiro meio a cerca de 5 x 10^5 células/mL. Em um aspecto mais específico, a referida segunda população de células é inicialmente inoculada no referido terceiro meio a cerca de 5 x 10^5 células/mL em um frasco giratório. Em um aspecto específico, a referida segunda população de células é inicialmente inoculada no referido terceiro meio a cerca de 3 x 10^5 células/mL. Em um aspecto mais específico, a referida segunda população de células é inicialmente inoculada no referido terceiro meio a cerca de 3 x 10^5 células/mL em uma cultura estática.

[042] Em certos aspectos, o método de três estágios divulgado neste documento produz pelo menos 5.000 vezes mais células exterminadoras

naturais em comparação com o número de células-tronco hematopoiéticas inicialmente inoculadas no referido primeiro meio. Em certos aspectos, o referido método de três estágios produz pelo menos 10.000 vezes mais células exterminadoras naturais em comparação com o número de células-tronco hematopoiéticas inicialmente inoculadas no referido primeiro meio. Em certos aspectos, o referido método de três estágios produz pelo menos 50.000 vezes mais células exterminadoras naturais em comparação com o número de células-tronco hematopoiéticas inicialmente inoculadas no referido primeiro meio. Em certos aspectos, o referido método de três estágios produz pelo menos 75.000 vezes mais células exterminadoras naturais em comparação com o número de células-tronco hematopoiéticas inicialmente inoculadas no referido primeiro meio. Em certos aspectos, a viabilidade das referidas células exterminadoras naturais é determinada por coloração com 7-aminoactinomicina D (7AAD). Em certos aspectos, a viabilidade das referidas células exterminadoras naturais é determinada por coloração com anexina-V. Em aspectos específicos, a viabilidade das referidas células exterminadoras naturais é determinada por coloração com 7-AAD e coloração com anexina-V. Em certos aspectos, a viabilidade das referidas células exterminadoras naturais é determinada por coloração com azul de tripano.

[043] Em certos aspectos, o método de três estágios divulgado neste documento produz pelo menos 5.000 vezes mais células ILC3 em comparação com o número de células-tronco hematopoiéticas inicialmente inoculadas no referido primeiro meio. Em certos aspectos, o referido método de três estágios produz pelo menos 10.000 vezes mais células ILC3 em comparação com o número de células-tronco hematopoiéticas inicialmente inoculadas no referido primeiro meio. Em certos aspectos, o referido método de três estágios produz pelo menos 50.000 vezes mais células ILC3 em comparação com o número de

células-tronco hematopoiéticas inicialmente inoculadas no referido primeiro meio. Em certos aspectos, o referido método de três estágios produz pelo menos 75.000 vezes mais células ILC3 em comparação com o número de células-tronco hematopoiéticas inicialmente inoculadas no referido primeiro meio.

[044] Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células exterminadoras naturais que compreendem pelo menos 20% de células exterminadoras naturais CD56 + CD3–. Em certos aspectos, o método de três estágios produz células exterminadoras naturais que compreendem pelo menos 40% de células exterminadoras naturais CD56 + CD3–. Em certos aspectos, o método de três estágios produz células exterminadoras naturais que compreendem pelo menos 60% de células exterminadoras naturais CD56 + CD3–. Em certos aspectos, o método de três estágios produz células exterminadoras naturais que compreendem pelo menos 70% de células exterminadoras naturais CD56 + CD3–. Em certos aspectos, o método de três estágios produz células exterminadoras naturais que compreendem pelo menos 75% de células exterminadoras naturais CD56 + CD3–. Em certos aspectos, o método de três estágios produz células exterminadoras naturais que compreendem pelo menos 80% de células exterminadoras naturais CD56 + CD3–.

[045] Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células exterminadoras naturais que compreendem pelo menos 20% de células exterminadoras naturais CD56+CD3–CD11a+. Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células exterminadoras naturais que compreendem pelo menos 40% de células exterminadoras naturais CD56+CD3–CD11a+. Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células exterminadoras naturais que compreendem pelo menos 60% de células exterminadoras naturais CD56+CD3–CD11a+. Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células exterminadoras naturais que

compreendem pelo menos 80% de células exterminadoras naturais CD56+CD3–CD11a+.

[046] Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células ILC3 que compreendem pelo menos 20% de células ILC3 CD56+CD3–CD11a-. Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células ILC3 que compreendem pelo menos 40% de células ILC3 CD56+CD3–CD11a-. Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células ILC3 que compreendem pelo menos 60% de células ILC3 CD56+CD3–CD11a-. Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células exterminadoras naturais que compreendem pelo menos 80% de células ILC3 CD56+CD3–CD11a-.

[047] Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células exterminadoras naturais que exibem pelo menos 20% de citotoxicidade contra células K562 quando as referidas células exterminadoras naturais e as referidas células K562 são co-cultivadas *in vitro* a uma razão de 10: 1. Em certos aspectos, o método de três estágios produz células exterminadoras naturais que exibem pelo menos 35% de citotoxicidade contra as células K562 quando as referidas células exterminadoras naturais e as referidas células K562 são co-cultivadas *in vitro em* uma razão de 10:1. Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células exterminadoras naturais que exibem pelo menos 45% de citotoxicidade contra células K562 quando as referidas células exterminadoras naturais e as referidas células K562 são co-cultivadas *in vitro* a uma razão de 10:1. Em certos aspectos, o método de três estágios produz células exterminadoras naturais que exibem pelo menos 60% de citotoxicidade contra as células K562 quando as referidas células exterminadoras naturais e as referidas células K562 são co-cultivadas *in vitro em* uma razão de 10:1. Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células

exterminadoras naturais que exibem pelo menos 75% de citotoxicidade contra células K562 quando as referidas células exterminadoras naturais e as referidas células K562 são co-cultivadas *in vitro* a uma razão de 10:1.

[048] Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células ILC3 que exibem pelo menos 20% de citotoxicidade contra células K562 quando as referidas células ILC3 e as referidas células K562 são co-cultivadas *in vitro* a uma razão de 10:1. Em certos aspectos, o método de três estágios produz células ILC3 que exibem pelo menos 35% de citotoxicidade contra as células K562 quando as referidas células ILC3 e as referidas células K562 são co-cultivadas *in vitro* em uma razão de 10:1. Em certos aspectos, o método de três estágios produz células ILC3 que exibem pelo menos 45% de citotoxicidade contra células K562 quando as referidas células ILC3 e as referidas células K562 são co-cultivadas *in vitro* a uma razão de 10:1. Em certos aspectos, o método de três estágios produz células ILC3 que exibem pelo menos 60% de citotoxicidade contra as células K562 quando as referidas células ILC3 e as referidas células K562 são co-cultivadas *in vitro* em uma razão de 10:1. Em certos aspectos, o método de três estágios produz células ILC3 que exibem pelo menos 75% de citotoxicidade contra células K562 quando as referidas células ILC3 e as referidas células K562 são co-cultivadas *in vitro* a uma razão de 10:1.

[049] Em certos aspectos, após a referida terceira etapa de cultura, a referida terceira população de células, *por exemplo*, a referida população de células exterminadoras naturais, é criopreservada. Em certos aspectos, após a referida quarta etapa de cultura, a referida quarta população de células, *por exemplo*, a referida população de células exterminadoras naturais, é criopreservada.

[050] Em certos aspectos, são fornecidas aqui populações de células compreendendo células exterminadoras naturais, *ou seja*, células

exterminadoras naturais produzidas por um método de três estágios aqui descrito. Por conseguinte, é fornecida aqui uma população de células exterminadoras naturais isolada produzida por um método de três estágios aqui descrito. Em uma modalidade específica, a referida população de células exterminadoras naturais compreende pelo menos 20% de células exterminadoras naturais CD56 + CD3–. Em uma modalidade específica, a referida população de células exterminadoras naturais compreende pelo menos 40% de células exterminadoras naturais CD56 + CD3–. Em uma modalidade específica, a referida população de células exterminadoras naturais compreende pelo menos 60% de células exterminadoras naturais CD56 + CD3–. Em uma modalidade específica, a referida população de células exterminadoras naturais compreende pelo menos 80% de células exterminadoras naturais CD56 + CD3–. Em modalidades específicas, a população de células exterminadoras naturais é formulada em uma composição farmacêutica adequada para uso *in vivo*, por exemplo, adequada para uso humano *in vivo.*

[051] Em certos aspectos, são fornecidas aqui populações de células compreendendo células ILC3, *ou seja*, células exterminadoras naturais produzidas por um método de três estágios aqui descrito. Em modalidades específicas, a população de células compreendendo células ILC3 é formulada em uma composição farmacêutica adequada para uso *in vivo*, por exemplo, adequada para uso humano *in vivo.*

[052] Em uma modalidade, é fornecida aqui uma população de células progenitoras NK isolada, em que as referidas células progenitoras NK são produzidas de acordo com o método de três estágios aqui descrito. Em modalidades específicas, a população de células progenitoras NK é formulada em uma composição farmacêutica adequada para uso *in vivo*, por exemplo, adequada para uso humano *in vivo.*

[053] Em outra modalidade, é fornecida aqui uma população de células NK maduras isoladas, em que as referidas células NK maduras são produzidas de acordo com o método de três estágios aqui descrito. Em modalidades específicas, a população de células NK maduras é formulada em uma composição farmacêutica adequada para uso *in vivo*, por exemplo, adequada para uso humano *in vivo.*

[054] Em outra modalidade, é fornecida aqui uma população de ILC3 isolada, em que as referidas células ILC3 são produzidas de acordo com o método de três estágios aqui descrito. Em modalidades específicas, a população de ILC3 isolada é formulada em uma composição farmacêutica adequada para uso *in vivo*, por exemplo, adequada para uso humano *in vivo.*

[055] Em outra modalidade, é fornecida aqui uma população de células, em que a referida população de células é a terceira população de células produzida por um método aqui descrito. Em outra modalidade, é fornecida aqui uma população de células, em que a referida população de células é a quarta população de células produzida por um método aqui descrito.

[056] Em outra modalidade, é fornecida aqui uma população de células NK isolada, em que as referidas células NK são ativadas, em que as referidas células NK ativadas são produzidas de acordo com o método de três estágios aqui descrito. Em modalidades específicas, a população de NK isolada é formulada em uma composição farmacêutica adequada para uso *in vivo*, por exemplo, adequada para uso humano *in vivo.*

[057] Consequentemente, em outro aspecto, é fornecido aqui o uso de populações de células NK produzidas usando os métodos de três estágios aqui descritos para suprimir a proliferação de células tumorais, tratar infecção viral ou tratar câncer, *por exemplo*, cânceres de sangue e tumores sólidos. Em certas modalidades, as populações de células NK são colocadas em contato com, ou

usadas em combinação com, um composto imunomodulador, *por exemplo*, um composto imunomodulador aqui descrito, ou talidomida. Em certas modalidades, as populações de células NK são tratadas ou usadas em combinação com um composto imunomodulador, *por exemplo*, um composto imunomodulador aqui descrito, ou talidomida.

[058] Em uma modalidade específica, o referido câncer é um tumor sólido. Em outra modalidade, o referido câncer é um câncer do sangue. Em modalidades específicas, o câncer é glioblastoma, carcinoma ductal primário, leucemia, leucemia aguda de células T, linfoma mieloide crônico (CML), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crônica (CML), carcinoma de pulmão, adenocarcinoma de cólon, linfoma histiocítico, carcinoma colorretal, adenocarcinoma colorretal, câncer de próstata, mieloma múltiplo ou retinoblastoma. Em modalidades mais específicas, o câncer é AML. Em modalidades mais específicas, o câncer é mieloma múltiplo.

[059] Em outra modalidade específica, as células hematopoiéticas, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras, a partir das quais as populações de células NK são produzidas, são obtidas a partir de perfusato placentário, sangue do cordão umbilical ou sangue periférico. Em uma modalidade, as células hematopoiéticas, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras, a partir das quais as populações de células NK são produzidas, são obtidas da placenta, *por exemplo*, do perfusato placentário. Em uma modalidade, as células hematopoiéticas, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras, a partir das quais as populações de células NK são produzidas, não são obtidas a partir do sangue do cordão umbilical. Em uma modalidade, as células hematopoiéticas, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras, a partir das quais as populações de células NK são produzidas, não são obtidas do sangue periférico.

Em outra modalidade específica, as células hematopoiéticas, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras, a partir das quais as populações de células NK são produzidas, são células combinadas do perfusato placentário e sangue do cordão umbilical, *por exemplo*, sangue do cordão da mesma placenta que o perfusato. Em outra modalidade específica, o referido sangue do cordão umbilical é isolado de uma placenta diferente da placenta da qual o referido perfusato placentário é obtido. Em certas modalidades, as células combinadas podem ser obtidas por agrupamento ou combinação do sangue do cordão umbilical e perfusato placentário. Em certas modalidades, o sangue do cordão umbilical e o perfusato placentário são combinados em uma razão de 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 ou semelhantes em volume para obter as células combinadas. Em uma modalidade específica, o sangue do cordão umbilical e o perfusato da placenta são combinados em uma razão de 10:1 a 1:10, de 5:1 a 1:5 ou de 3:1 a 1:3. Em outra modalidade específica, o sangue do cordão umbilical e o perfusato placentário são combinados em uma razão de 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 ou 1:10. Em uma modalidade mais específica, o sangue do cordão umbilical e o perfusato da placenta são combinados em uma razão de 8,5: 1,5 (85%: 15%).

[060] Em certas modalidades, o sangue do cordão umbilical e o perfusato placentário são combinados em uma razão de 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15,

1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 ou semelhantes, conforme determinado pelo teor de células nucleadas totais (TNC) para obter as células combinadas. Em uma modalidade específica, o sangue do cordão umbilical e o perfusato da placenta são combinados em uma razão de 10:1 a 10:1, de 5:1 a 1:5 ou de 3:1 a 1:3. Em outra modalidade específica, o sangue do cordão umbilical e o perfusato placentário são combinados em uma razão de 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 ou 1:10.

[061] Em uma modalidade, portanto, é fornecido aqui um método de tratamento de um indivíduo com câncer ou uma infecção viral, compreendendo a administração ao referido indivíduo de uma quantidade eficaz de células de uma população de células NK isolada produzida usando os métodos de três estágios descritos neste documento. Em determinadas modalidades, o câncer é um tumor sólido. Em certas modalidades, o câncer é um câncer hematológico. Em uma modalidade específica, o câncer hematológico é a leucemia. Em outra modalidade específica, o câncer hematológico é o linfoma. Em outra modalidade específica, o câncer hematológico é leucemia mieloide aguda. Em outra modalidade específica, o câncer hematológico é a leucemia linfocítica crônica. Em outra modalidade específica, o câncer hematológico é a leucemia mieloide crônica. Em certos aspectos, as referidas células exterminadoras naturais foram criopreservadas antes do referido contato ou da referida administração. Em outros aspectos, as referidas células exterminadoras naturais não foram criopreservadas antes do referido contato ou da referida administração.

[062] Em uma modalidade específica, as populações de células NK produzidas usando os métodos de três estágios descritos neste documento foram tratadas com um composto imunomodulador, *por exemplo*, um composto imunomodulador descrito neste documento, ou talidomida, antes da referida administração. Em uma modalidade específica, as populações de células NK

produzidas usando os métodos de três estágios aqui descritos foram tratadas com IL2 e IL12 e IL18, IL12 e IL15, IL12 e IL18, IL2 e IL12 e IL15 e IL18, ou IL2 e IL15 e IL18 antes da referida administração. Em outra modalidade específica, a população de células NK isolada produzida usando os métodos de três estágios aqui descritos foi pré-tratada com um ou mais de IL2, IL12, IL18 ou IL15 antes da referida administração. Em outra modalidade específica, o método compreende a administração ao indivíduo (1) de uma quantidade eficaz de uma população de células NK isolada produzida usando um método de três estágios aqui descrito; e (2) uma quantidade eficaz de um composto imunomodulador ou talidomida. Uma "quantidade eficaz" neste contexto significa uma quantidade de células em uma população de células NK e, opcionalmente, composto imunomodulador ou talidomida, que resulta em uma melhora detectável em um ou mais sintomas do referido câncer ou infecção, em comparação com um indivíduo tendo câncer ou a referida infecção a quem não foi administrada a referida população de células NK e, opcionalmente, um composto imunomodulador ou talidomida. Em uma modalidade específica, o referido composto imunomodulador é lenalidomida ou pomalidomida. Em outra modalidade, o método compreende adicionalmente a administração de um composto anticâncer ao indivíduo, *por exemplo*, um ou mais dos compostos anticâncer descritos abaixo.

[063] Em outra modalidade, é fornecido aqui um método de suprimir a proliferação de células tumorais compreendendo colocar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma população de células NK em proximidade com as células tumorais, *por exemplo*, colocando das células tumorais em contato com as células em uma população de células NK. Daqui em diante, a menos que indicado de outra forma, o termo "proximidade" se refere a proximidade suficiente para obter o resultado desejado; *por exemplo*, em certas modalidades, o termo proximidade se refere ao contato. Em certas modalidades, o referido

contato acontece *in vitro.* Em certas modalidades, o referido contato acontece *ex vivo.* Em outras modalidades, o referido contato acontece *in vivo.* Uma pluralidade de células NK pode ser usada no método de suprimir a proliferação das células tumorais compreendendo trazer uma quantidade terapeuticamente eficaz da população de células NK em proximidade com as células tumorais, *por exemplo*, colocando as células tumorais em contato com as células na população de células NK. Em certas modalidades, as referidas células tumorais são células de câncer de mama, células de câncer de cabeça e pescoço ou células de sarcoma. Em determinadas modalidades, as ditas células tumorais são células de carcinoma dutal primário, células de leucemia, células de leucemia de célula T aguda, células de linfoma mieloide crônico (CML), células de leucemia mieloide crônica (CML), células de carcinoma de pulmão, células de adenocarcinoma de cólon, células de linfoma histiocítico, células de carcinoma colorretal, células de adenocarcinoma colorretal ou células de retinoblastoma.

[064] Em uma modalidade, são fornecidas aqui uma pluralidade de células exterminadoras naturais para uso em um método de suprimir a proliferação de células tumorais compreendendo o contato das células tumorais com a pluralidade de células exterminadoras naturais, em que as células exterminadoras naturais são produzidas pelos métodos aqui descritos. Em certas modalidades, o referido contato ocorre em um indivíduo humano. Em certas modalidades, o referido método compreende a administração das referidas células exterminadoras naturais ao referido indivíduo. Em certas modalidades, as referidas células tumorais são células de mieloma múltiplo. Em certas modalidades, as referidas células tumorais são células de leucemia mieloide aguda (AML). Em certas modalidades, o referido indivíduo tem AML recidivante/refratária. Em certas modalidades, o referido indivíduo tem AML que falhou em pelo menos uma célula linfoide não inata (ILC) terapêutica contra

AML. Em certas modalidades, o referido indivíduo tem 65 anos ou mais e está em primeira remissão. Em certas modalidades, o referido indivíduo foi condicionado com fludarabina, citarabina ou ambos antes da administração das referidas células NK. Em certas modalidades, as referidas células tumorais são células de câncer de mama, células de câncer de cabeça e pescoço ou células de sarcoma. Em determinadas modalidades, as ditas células tumorais são células de carcinoma ductal primário, células de leucemia, células de leucemia de células T agudas, células de linfoma mieloide crônico (CML), células de leucemia mieloide crônica (CML), células de carcinoma de pulmão, células de adenocarcinoma de cólon, células de linfoma histiocítico, células de carcinoma colorretal, células de adenocarcinoma colorretal ou células de retinoblastoma. Em certas modalidades, as referidas células tumorais são células tumorais sólidas, células tumorais do fígado, células tumorais do pulmão, células tumorais pancreáticas, células tumorais renais ou células de glioblastoma multiforme (GBM). Em certas modalidades, as referidas células exterminadoras naturais são administradas com um anticorpo anti-CD33, um anticorpo anti-CD20, um anticorpo anti-CD138 ou um anticorpo anti-CD32. Em certas modalidades, as referidas células NK foram ou não criopreservadas antes do referido contato ou da referida administração.

[065] A administração de uma população isolada de células NK ou uma composição farmacêutica das mesmas pode ser sistêmica ou local. Em modalidades específicas, a administração é parenteral. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células NK ou uma composição farmacêutica da mesma a um sujeito é por injeção, infusão, administração intravenosa (IV), administração intrafemoral ou administração intratumoral. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células NK ou uma composição farmacêutica das mesmas a um sujeito

é realizada com um dispositivo, uma matriz ou um suporte. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células NK ou uma composição farmacêutica das mesmas a um sujeito é por injeção. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células NK ou uma composição farmacêutica das mesmas a um sujeito é por meio de um cateter. Em modalidades específicas, a injeção de células NK é uma injeção local. Em modalidades mais específicas, a injeção local é diretamente em um tumor sólido (*por exemplo*, um sarcoma). Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células NK ou uma composição farmacêutica das mesmas a um sujeito é por injeção por seringa. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células NK ou uma composição farmacêutica das mesmas a um sujeito é por meio de uma administração guiada. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células NK ou uma composição farmacêutica da mesma a um sujeito por injeção é auxiliada por laparoscopia, endoscopia, ultrassom, tomografia computadorizada, ressonância magnética ou radiologia.

[066] Em uma modalidade específica, a população de células NK isolada produzida usando os métodos de três estágios descritos neste documento foi tratada com um composto imunomodulador, *por exemplo*, um composto imunomodulador descrito neste documento, abaixo, ou talidomida e/ou IL2 e IL12 e IL18, IL12 e IL15, IL12 e IL18, IL2 e IL12 e IL15 e IL18, ou IL2 e IL15 e IL18, antes do referido contato ou aproximação. Em outra modalidade específica, a população de células NK isolada produzida usando os métodos de três estágios aqui descritos foi tratada com um ou mais de IL2, IL12, IL18 ou IL15 antes do dito contato ou proximidade. Em outra modalidade específica, uma quantidade eficaz de um composto imunomodulador, *por exemplo*, um composto imunomodulador descrito aqui, abaixo, ou talidomida é adicionalmente trazida

para a proximidade com as células tumorais, *por exemplo*, as células tumorais são colocadas em contato com o composto imunomodulador ou talidomida. Uma "quantidade eficaz" neste contexto significa uma quantidade de células em uma população de células NK e, opcionalmente, um composto imunomodulador ou talidomida, que resulta em uma supressão detectável das referidas células tumorais em comparação com um número equivalente de células tumorais não contatadas ou colocadas em proximidade com células em uma população de células NK e, opcionalmente, um composto imunomodulador ou talidomida. Em outra modalidade específica, o método compreende ainda trazer uma quantidade eficaz de um composto anticâncer, *por exemplo*, um composto anticâncer descrito abaixo, em proximidade com as células tumorais, *por exemplo*, o contato das células tumorais com o composto anticâncer.

[067] Em uma modalidade específica deste método, as células tumorais são células cancerosas do sangue. Em outra modalidade específica, as células tumorais são células tumorais sólidas. Em outra modalidade, as células tumorais são células de carcinoma ductal primário, células de leucemia, células de leucemia de células T agudas, células de linfoma mieloide crônico (CML), células de leucemia mielóide aguda (AML), células de leucemia mielóide crônica (CML), células de glioblastoma, pulmão células de carcinoma, células de adenocarcinoma do cólon, células de linfoma histiocítico, células de mieloma múltiplo, células de retinoblastoma, células de carcinoma colorretal, células de câncer de próstata ou células de adenocarcinoma colorretal. Em modalidades mais específicas, as células tumorais são células AML. Em modalidades mais específicas, as células tumorais são células de mieloma múltiplo. Em outra modalidade específica, o referido contato ou aproximação ocorre *in vitro*. Em outra modalidade específica, o referido contato ou aproximação ocorre *ex vivo*. Em outra modalidade específica, o referido contato ou aproximação ocorre *in*

vivo. Em uma modalidade mais específica, o referido contato *in vivo* ou aproximação ocorre em um ser humano. Em uma modalidade específica, as referidas células tumorais são células tumorais sólidas. Em uma modalidade específica, as referidas células tumorais são células tumorais do fígado. Em uma modalidade específica, as referidas células tumorais são células tumorais do pulmão. Em uma modalidade específica, as referidas células tumorais são células tumorais pancreáticas. Em uma modalidade específica, as referidas células tumorais são células tumorais renais. Em uma modalidade específica, as referidas células tumorais são células de glioblastoma multiforme (GBM). Em uma modalidade específica, as referidas células exterminadoras naturais são administradas com um anticorpo. Em uma modalidade específica, as referidas células exterminadoras naturais são administradas com um anticorpo anti-CD33. Em uma modalidade específica, as referidas células exterminadoras naturais são administradas com um anticorpo anti-CD20. Em uma modalidade específica, as referidas células exterminadoras naturais são administradas com um anticorpo anti-CD138. Em uma modalidade específica, as referidas células exterminadoras naturais são administradas com um anticorpo anti-CD32.

[068] Em outro aspecto, é fornecido aqui um método de tratamento de um indivíduo com mieloma múltiplo, compreendendo a administração ao indivíduo de (1) lenalidomida; (2) melfalano; e (3) células NK, em que as referidas células NK são eficazes para tratar mieloma múltiplo no referido indivíduo. Em uma modalidade específica, as referidas células NK são células NK do cordão umbilical ou células NK produzidas a partir de células hematopoiéticas do sangue do cordão, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas. Em outra modalidade, as referidas células NK foram produzidas por qualquer um dos métodos aqui descritos para a produção de células NK, *por exemplo*, para a produção de populações de células NK usando um método de três estágios. Em outra

modalidade, as referidas células NK foram expandidas antes da referida administração. Em outra modalidade, as referidas células lenalidomida, melfalano e/ou NK são administradas separadamente umas das outras. Em certas modalidades específicas do método de tratamento de um indivíduo com mieloma múltiplo, as referidas populações de células NK são produzidas por um método de três estágios, conforme descrito neste documento.

[069] Em outro aspecto, é fornecido aqui um método de tratamento de um indivíduo com leucemia mieloide aguda (AML), compreendendo a administração às células NK individuais (opcionalmente ativadas por pré-tratamento com IL2 e IL12 e IL18, IL12 e IL15, IL12 e IL18, IL2 e IL12 e IL15 e IL18, ou IL2 e IL15 e IL18), em que as referidas células NK são eficazes para tratar AML no referido indivíduo. Em uma modalidade específica, a população de células NK isolada produzida usando os métodos de três estágios aqui descritos foi pré-tratada com um ou mais de IL2, IL12, IL18 ou IL15 antes da referida administração. Em uma modalidade específica, as referidas células NK são células NK do cordão umbilical ou células NK produzidas a partir de células hematopoiéticas do sangue do cordão, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas. Em outra modalidade, as referidas células NK foram produzidas por qualquer um dos métodos aqui descritos para a produção de células NK, *por exemplo*, para a produção de populações de células NK usando um método de três estágios conforme apresentado aqui. Em certas modalidades específicas do método de tratamento de um indivíduo com AML, as referidas populações de células NK são produzidas por um método de três estágios, conforme descrito neste documento. Em uma modalidade particular, a AML a ser tratada pelos métodos anteriores compreende AML refratária, AML de mau prognóstico ou AML infantil. Em certas modalidades, o referido indivíduo tem AML que falhou em pelo menos uma AML contra terapêutica por célula não exterminadora natural ou linfoide não inata.

Em modalidades específicas, o referido indivíduo tem 65 anos ou mais e está em primeira remissão. Em modalidades específicas, o referido indivíduo foi condicionado com fludarabina, citarabina ou ambos antes da administração das referidas células exterminadoras naturais. Em outro aspecto, é fornecido aqui um método de tratamento de um indivíduo com leucemia linfocítica crônica (CLL), compreendendo a administração ao indivíduo de uma dose terapeuticamente eficaz de (1) lenalidomida; (2) melfalano; (3) fludarabina; e (4) células NK, *por exemplo*, uma população de células NK produzida usando um método de três estágios aqui descrito, em que as referidas células NK são eficazes para tratar a referida CLL no referido indivíduo. Em uma modalidade específica, as referidas células NK são células NK do cordão umbilical ou células NK produzidas a partir de células hematopoiéticas do sangue do cordão, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas. Em outra modalidade, as referidas células NK foram produzidas por qualquer um dos métodos aqui descritos para a produção de células NK, *por exemplo*, para a produção de populações de células NK usando um método de três estágios descrito aqui. Em uma modalidade específica de qualquer um dos métodos acima, as referidas células lenalidomida, melfalan, fludarabina e NK expandidas são administradas ao referido indivíduo separadamente. Em certas modalidades específicas do método de tratamento de um indivíduo com CLL, as referidas populações de células NK são produzidas por um método de três estágios, conforme descrito neste documento.

[070] Em outra modalidade, é fornecido aqui um método de suprimir a proliferação de células tumorais compreendendo colocar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma população de células ILC3 em proximidade com as células tumorais, *por exemplo*, colocando das células tumorais em contato com as células em uma população de células ILC3. Daqui em diante, a menos que

indicado de outra forma, o termo "proximidade" se refere a proximidade suficiente para obter o resultado desejado; *por exemplo*, em certas modalidades, o termo proximidade se refere ao contato. Em certas modalidades, o referido contato acontece *in vitro*. Em certas modalidades, o referido contato acontece *ex vivo*. Em outras modalidades, o referido contato acontece *in vivo.* Uma pluralidade de células ILC3 pode ser usada no método de suprimir a proliferação das células tumorais compreendendo trazer uma quantidade terapeuticamente eficaz da população de células ILC3 em proximidade com as células tumorais, *por exemplo*, colocando as células tumorais em contato com as células na população de células ILC3. Em certas modalidades, as referidas células tumorais são células de câncer de mama, células de câncer de cabeça e pescoço ou células de sarcoma. Em determinadas modalidades, as ditas células tumorais são células de carcinoma dutal primário, células de leucemia, células de leucemia de célula T aguda, células de linfoma mieloide crônico (CML), células de leucemia mieloide crônica (CML), células de carcinoma de pulmão, células de adenocarcinoma de cólon, células de linfoma histiocítico, células de carcinoma colorretal, células de adenocarcinoma colorretal ou células de retinoblastoma.

[071] Em uma modalidade, são fornecidas aqui uma pluralidade de células ILC3 para uso em um método de suprimir a proliferação de células tumorais compreendendo o contato das células tumorais com a pluralidade de células ILC3, em que as células ILC3 são produzidas pelos métodos aqui descritos. Em certas modalidades, o referido contato ocorre em um indivíduo humano. Em certas modalidades, o referido método compreende a administração das referidas células ILC3 ao referido indivíduo. Em certas modalidades, as referidas células tumorais são células de mieloma múltiplo. Em certas modalidades, as referidas células tumorais são células de leucemia mieloide aguda (AML). Em certas modalidades, o referido indivíduo tem AML recidivante/refratária. Em

certas modalidades, o referido indivíduo tem AML que falhou em pelo menos uma célula linfoide não inata (ILC) terapêutica contra AML. Em certas modalidades, o referido indivíduo tem 65 anos ou mais e está em primeira remissão. Em certas modalidades, o referido indivíduo foi condicionado com fludarabina, citarabina ou ambos antes da administração das referidas células ILC3. Em certas modalidades, as referidas células tumorais são células de câncer de mama, células de câncer de cabeça e pescoço ou células de sarcoma. Em determinadas modalidades, as ditas células tumorais são células de carcinoma ductal primário, células de leucemia, células de leucemia de células T agudas, células de linfoma mieloide crônico (CML), células de leucemia mieloide crônica (CML), células de carcinoma de pulmão, células de adenocarcinoma de cólon, células de linfoma histiocítico, células de carcinoma colorretal, células de adenocarcinoma colorretal ou células de retinoblastoma. Em certas modalidades, as referidas células tumorais são células tumorais sólidas, células tumorais do fígado, células tumorais do pulmão, células tumorais pancreáticas, células tumorais renais ou células de glioblastoma multiforme (GBM). Em certas modalidades, as referidas células ILC3 são administradas com um anticorpo anti-CD33, um anticorpo anti-CD20, um anticorpo anti-CD138 ou um anticorpo anti-CD32. Em certas modalidades, as referidas células ILC3 foram ou não criopreservadas antes do referido contato ou da referida administração.

[072] A administração de uma população isolada de células ILC3 ou uma composição farmacêutica das mesmas pode ser sistêmica ou local. Em modalidades específicas, a administração é parenteral. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células ILC3 ou uma composição farmacêutica da mesma a um sujeito é por injeção, infusão, administração intravenosa (IV), administração intrafemoral ou administração intratumoral. Em modalidades específicas, a administração de uma população

isolada de células ILC3 ou uma composição farmacêutica das mesmas a um sujeito é realizada com um dispositivo, uma matriz ou um suporte. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células ILC3 ou uma composição farmacêutica das mesmas a um sujeito é por injeção. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células ILC3 ou uma composição farmacêutica das mesmas a um sujeito é por meio de um cateter. Em modalidades específicas, a injeção de células ILC3 é uma injeção local. Em modalidades mais específicas, a injeção local é diretamente em um tumor sólido (*por exemplo*, um sarcoma). Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células ILC3 ou uma composição farmacêutica das mesmas a um sujeito é por injeção por seringa. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células ILC3 ou uma composição farmacêutica das mesmas a um sujeito é por meio de uma administração guiada. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células ILC3 ou uma composição farmacêutica da mesma a um sujeito por injeção é auxiliada por laparoscopia, endoscopia, ultrassom, tomografia computadorizada, ressonância magnética ou radiologia.

[073] Em uma modalidade específica, a população de células ILC3 isolada produzida usando os métodos de três estágios descritos neste documento foi tratada com um composto imunomodulador, *por exemplo*, um composto imunomodulador descrito neste documento, abaixo, ou talidomida e/ou IL2 e IL12 e IL18, IL12 e IL15, IL12 e IL18, IL2 e IL12 e IL15 e IL18, ou IL2 e IL15 e IL18, antes do referido contato ou aproximação. Em uma modalidade específica, a população de células NK isolada produzida usando os métodos de três estágios aqui descritos foi tratada com um ou mais de IL2, IL12, IL18 ou IL15 antes do dito contato ou proximidade. Em outra modalidade específica, uma quantidade eficaz de um composto imunomodulador, *por exemplo*, um composto

imunomodulador descrito aqui, abaixo, ou talidomida é adicionalmente trazida para a proximidade com as células tumorais, *por exemplo*, as células tumorais são colocadas em contato com o composto imunomodulador ou talidomida. Uma "quantidade eficaz" neste contexto significa uma quantidade de células em uma população de células ILC3 e, opcionalmente, um composto imunomodulador ou talidomida, que resulta em uma supressão detectável das referidas células tumorais em comparação com um número equivalente de células tumorais não contatadas ou colocadas em proximidade com células em uma população de células ILC3 e, opcionalmente, um composto imunomodulador ou talidomida. Em outra modalidade específica, o método compreende ainda trazer uma quantidade eficaz de um composto anticâncer, *por exemplo*, um composto anticâncer descrito abaixo, em proximidade com as células tumorais, *por exemplo*, o contato das células tumorais com o composto anticâncer.

[074] Em uma modalidade específica deste método, as células tumorais são células cancerosas do sangue. Em outra modalidade específica, as células tumorais são células tumorais sólidas. Em outra modalidade, as células tumorais são células de carcinoma ductal primário, células de leucemia, células de leucemia de células T agudas, células de linfoma mieloide crônico (CML), células de leucemia mielóide aguda (AML), células de leucemia mielóide crônica (CML), células de glioblastoma, pulmão células de carcinoma, células de adenocarcinoma do cólon, células de linfoma histiocítico, células de mieloma múltiplo, células de retinoblastoma, células de carcinoma colorretal, células de câncer de próstata ou células de adenocarcinoma colorretal. Em outra modalidade específica, o referido contato ou aproximação ocorre *in vitro*. Em outra modalidade específica, o referido contato ou aproximação ocorre *ex vivo*. Em outra modalidade específica, o referido contato ou aproximação ocorre *in*

vivo. Em uma modalidade mais específica, o referido contato *in vivo* ou aproximação ocorre em um ser humano. Em uma modalidade específica, as referidas células tumorais são células tumorais sólidas. Em uma modalidade específica, as referidas células tumorais são células tumorais do fígado. Em uma modalidade específica, as referidas células tumorais são células tumorais do pulmão. Em uma modalidade específica, as referidas células tumorais são células tumorais pancreáticas. Em uma modalidade específica, as referidas células tumorais são células tumorais renais. Em uma modalidade específica, as referidas células tumorais são células de glioblastoma multiforme (GBM). Em uma modalidade específica, as referidas células ILC3 são administradas com um anticorpo. Em uma modalidade específica, as referidas células ILC3 são administradas com um anticorpo anti-CD33. Em uma modalidade específica, as referidas células ILC3 são administradas com um anticorpo anti-CD20. Em uma modalidade específica, as referidas células ILC3 são administradas com um anticorpo anti-CD138. Em uma modalidade específica, as referidas células ILC3 são administradas com um anticorpo anti-CD32.

[075] Em outro aspecto, é fornecido aqui um método de tratamento de um indivíduo com mieloma múltiplo, compreendendo a administração ao indivíduo de (1) lenalidomida; (2) melfalano; e (3) células ILC3, em que as referidas células ILC3 são eficazes para tratar mieloma múltiplo no referido indivíduo. Em uma modalidade específica, as referidas células ILC3 são células ILC3 do cordão umbilical ou células ILC3 produzidas a partir de células hematopoiéticas do sangue do cordão, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas. Em outra modalidade, as referidas células ILC3 foram produzidas por qualquer um dos métodos aqui descritos para a produção de células ILC3, *por exemplo*, para a produção de populações de células ILC3 usando um método de três estágios. Em outra modalidade, as referidas células ILC3 foram expandidas antes da referida

administração. Em outra modalidade, as referidas células lenalidomida, melfalano e/ou ILC3 são administradas separadamente umas das outras. Em certas modalidades específicas do método de tratamento de um indivíduo com mieloma múltiplo, as referidas populações de células ILC3 são produzidas por um método de três estágios, conforme descrito neste documento.

[076] Em outro aspecto, é fornecido aqui um método de tratamento de um indivíduo com leucemia mieloide aguda (AML), compreendendo a administração às células ILC3 individuais (opcionalmente ativadas por pré-tratamento com IL2 e IL12 e IL18, IL12 e IL15, IL12 e IL18, IL2 e IL12 e IL15 e IL18, ou IL2 e IL15 e IL18), em que as referidas células ILC3 são eficazes para tratar AML no referido indivíduo. Em uma modalidade específica, a população de células NK isolada produzida usando os métodos de três estágios aqui descritos foi pré-tratada com um ou mais de IL2, IL12, IL18 ou IL15 antes da referida administração. Em uma modalidade específica, as referidas células ILC3 são células ILC3 do cordão umbilical ou células ILC3 produzidas a partir de células hematopoiéticas do sangue do cordão, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas. Em outra modalidade, as referidas células ILC3 foram produzidas por qualquer um dos métodos aqui descritos para a produção de células ILC3, *por exemplo*, para a produção de populações de células ILC3 usando um método de três estágios conforme apresentado aqui. Em certas modalidades específicas do método de tratamento de um indivíduo com AML, as referidas populações de células ILC3 são produzidas por um método de três estágios, conforme descrito neste documento. Em uma modalidade particular, a AML a ser tratada pelos métodos anteriores compreende AML refratária, AML de mau prognóstico ou AML infantil. Em certas modalidades, o referido indivíduo tem AML que falhou em pelo menos uma AML contra terapêutica de célula linfoide não ILC3 ou não inata. Em modalidades específicas, o referido indivíduo tem 65 anos ou mais e está em

primeira remissão. Em modalidades específicas, o referido indivíduo foi condicionado com fludarabina, citarabina ou ambos antes da administração das referidas células ILC3. Em outro aspecto, é fornecido aqui um método de tratamento de um indivíduo com leucemia linfocítica crônica (CLL), compreendendo a administração ao indivíduo de uma dose terapeuticamente eficaz de (1) lenalidomida; (2) melfalano; (3) fludarabina; e (4) células ILC3, *por exemplo*, uma população de células ILC3 produzida usando um método de três estágios aqui descrito, em que as referidas células ILC3 são eficazes para tratar a referida CLL no referido indivíduo. Em uma modalidade específica, as referidas células ILC3 são células ILC3 do cordão umbilical ou células ILC3 produzidas a partir de células hematopoiéticas do sangue do cordão, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas. Em outra modalidade, as referidas células ILC3 foram produzidas por qualquer um dos métodos aqui descritos para a produção de células ILC3, *por exemplo*, para a produção de populações de células ILC3 usando um método de três estágios descrito aqui. Em uma modalidade específica de qualquer um dos métodos acima, as referidas células lenalidomida, melfalan, fludarabina e ILC3 expandidas são administradas ao referido indivíduo separadamente. Em certas modalidades específicas do método de tratamento de um indivíduo com CLL, as referidas populações de células ILC3 são produzidas por um método de três estágios, conforme descrito neste documento.

[077] Em certas modalidades, as populações de células NK produzidas usando um método de três estágios aqui descrito são criopreservadas, *por exemplo*, criopreservadas usando um método aqui descrito. Em certas modalidades, as populações de células NK produzidas usando um método de três estágios aqui descrito são criopreservadas em um meio de criopreservação, *por exemplo*, um meio de criopreservação aqui descrito. Em uma modalidade específica, a criopreservação das populações de células progenitoras NK e/ou

populações de células NK produzidas usando um método de três estágios aqui descrito compreende (1) preparar uma solução de suspensão de células compreendendo uma população de células progenitoras NK e/ou uma população de células NK produzida usando um método de três estágios aqui descrito; (2) adicionar meio de criopreservação à solução de suspensão de células da etapa (1) para obter uma suspensão de células criopreservadas; (3) resfriar a suspensão de células criopreservadas da etapa (3) para obter uma amostra criopreservada; e (4) armazenar a amostra criopreservada abaixo de -80 °C.

[078] Em certas modalidades dos métodos de tratamento ou supressão tumoral acima, as populações de células NK produzidas por um método de três estágios aqui descrito são combinadas com outras células exterminadoras naturais, *por exemplo*, células exterminadoras naturais isoladas de perfusato placentário, sangue do cordão umbilical ou sangue periférico, ou produzida a partir de células hematopoiéticas por um método diferente. Em modalidades específicas, as populações de células exterminadoras naturais são combinadas com células exterminadoras naturais de outra fonte, ou feitas por um método diferente, em uma proporção de cerca de 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 ou semelhantes.

[079] Em certas modalidades, as populações de células ILC3 produzidas usando um método de três estágios aqui descrito são criopreservadas, *por exemplo*, criopreservadas usando um método aqui descrito. Em certas modalidades, as populações de células ILC3 produzidas usando um método de

três estágios aqui descrito são criopreservadas em um meio de criopreservação, *por exemplo*, um meio de criopreservação aqui descrito. Em uma modalidade específica, a criopreservação das populações de células progenitoras ILC3 e/ou populações de células ILC3 produzidas usando um método de três estágios aqui descrito compreende (1) preparar uma solução de suspensão de células compreendendo uma população de células progenitoras ILC3 e/ou uma população de células ILC3 produzida usando um método de três estágios aqui descrito; (2) adicionar meio de criopreservação à solução de suspensão de células da etapa (1) para obter uma suspensão de células criopreservadas; (3) resfriar a suspensão de células criopreservadas da etapa (3) para obter uma amostra criopreservada; e (4) armazenar a amostra criopreservada abaixo de -80 °C.

[080] Em certas modalidades dos métodos de tratamento ou supressão tumoral acima, as populações de células ILC3 produzidas por um método de três estágios aqui descrito são combinadas com outras células ILC3, *por exemplo*, células ILC3 isoladas de perfusato placentário, sangue do cordão umbilical ou sangue periférico, ou produzida a partir de células hematopoiéticas por um método diferente. Em modalidades específicas, as populações de células ILC3 são combinadas com células ILC3 de outra fonte, ou feitas por um método diferente, em uma proporção de cerca de 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 ou semelhantes.

[081] Em outro aspecto, é fornecido aqui um método de reparação do trato gastrointestinal após a quimioterapia, compreendendo a administração a um

indivíduo de uma pluralidade de células ILC3, em que as células ILC3 são produzidas por um método de três estágios aqui descrito. Uma pluralidade de células ILC3 pode ser usada no método de reparação do trato gastrointestinal após quimioterapia, compreendendo a administração a um indivíduo de uma pluralidade de células ILC3, em que as células ILC3 são produzidas por um método de três estágios aqui descrito.

[082] Em outro aspecto, é fornecido aqui um método de proteção de um indivíduo contra a radiação, compreendendo a administração a um indivíduo de uma pluralidade de células ILC3, em que as células ILC3 são produzidas por um método de três estágios aqui descrito. Uma pluralidade de células ILC3 pode ser usada no método de proteção de um indivíduo contra radiação compreendendo a administração a um indivíduo de uma pluralidade de células ILC3, em que as células ILC3 são produzidas por um método de três estágios aqui descrito. Em certos aspectos do método, as referidas células ILC3 são usadas como um adjuvante para o transplante de medula óssea.

[083] Em outro aspecto, é fornecido aqui um método de reconstituição do timo de um indivíduo compreendendo a administração a um indivíduo de uma pluralidade de células ILC3, em que as células ILC3 são produzidas por um método de três estágios aqui descrito. Uma pluralidade de células ILC3 pode ser usada no método de reconstituição do timo de um indivíduo compreendendo a administração a um indivíduo de uma pluralidade de células ILC3, em que as células ILC3 são produzidas por um método de três estágios aqui descrito.

[084] Em outro aspecto, é fornecida aqui uma composição compreendendo células NK isoladas produzidas por um método de três estágios aqui descrito. Em uma modalidade específica, as referidas células NK são produzidas a partir de células hematopoiéticas, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras isoladas de perfusato placentário, sangue do cordão

umbilical e/ou sangue periférico. Em outra modalidade específica, as referidas células NK compreendem pelo menos 70% das células na composição. Em outra modalidade específica, as referidas células NK compreendem pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99% das células na composição. Em certas modalidades, pelo menos 80%, 82%, 84%, 86%, 88% ou 90% das células NK na referida composição são $CD3^{-}$ e $CD56^{+}$. Em certas modalidades, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88% ou 90% das células NK na referida composição são CD16-. Em certas modalidades, pelo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% ou 60% das células NK na referida composição são CD94 +.

[085] Em certos aspectos, é fornecida aqui uma população de células exterminadoras naturais que é CD56 + CD3– CD117 + CD11a +, em que as referidas células exterminadoras naturais expressam perforina e/ou EOMES e não expressam um ou mais de RORγt, receptor de hidrocarboneto de arila, e IL1R1. Em certos aspectos, as referidas células exterminadoras naturais expressam perforina e EOMES, e não expressam qualquer um de RORγt, receptor de hidrocarboneto de arila ou IL1R1. Em certos aspectos, as referidas células exterminadoras naturais expressam adicionalmente T-bet, GZMB, NKp46, NKp30 e NKG2D. Em certos aspectos, as referidas células exterminadoras naturais expressam CD94. Em certos aspectos, as referidas células exterminadoras naturais não expressam CD94.

[086] Em certos aspectos, é fornecida aqui uma população de células ILC3 que é CD56 + CD3– CD117 + CD11a-, em que as referidas células ILC3 expressam um ou mais de RORγt, receptor de hidrocarboneto de arila e IL1R1, e não expressam um ou mais de CD94, perforina e EOMES. Em certos aspectos, as referidas células ILC3 expressam RORγt, receptor de hidrocarboneto de arila e IL1R1, e não expressam nenhum de CD94, perforina ou EOMES. Em certos

aspectos, as referidas células ILC3 expressam adicionalmente CD226 e/ou 2B4. Em certos aspectos, as referidas células ILC3 expressam adicionalmente um ou mais de IL-22, TNFα e DNAM-1. Em certos aspectos, as referidas células ILC3 expressam CD226, 2B4, IL-22, TNFα e DNAM-1.

[087] Em certos aspectos, é fornecido aqui um método de produção de uma população de células compreendendo células exterminadoras naturais e células ILC3, compreendendo (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir um primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem cada um de um agente de mobilização de células-tronco e LMWH, para produzir uma terceira população de células; e (d) separar células CD11a + e células CD11a– da terceira população de células; e (e) combinar as células CD11a + com as células CD11a– em uma razão de 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 ou 1:50 para produzir uma quarta população de células. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular. Em certos aspectos, na quarta população de células, as

células CD11a + e CD11a– são combinadas em uma razão de 50:1. Em certos aspectos, na quarta população de células, as células CD11a + e CD11a– são combinadas em uma razão de 20:1. Em certos aspectos, na quarta população de células, as células CD11a + e CD11a– são combinadas em uma razão de 10:1. Em certos aspectos, na quarta população de células, as células CD11a + e CD11a– são combinadas em uma razão de 5:1. Em certos aspectos, na quarta população de células, as células CD11a + e CD11a– são combinadas em uma razão de 1:1. Em certos aspectos, na quarta população de células, as células CD11a + e CD11a– são combinadas em uma razão de 1:5. Em certos aspectos, na quarta população de células, as células CD11a + e CD11a– são combinadas em uma razão de 1:10. Em certos aspectos, na quarta população de células, as células CD11a + e CD11a– são combinadas em uma razão de 1:20. Em certos aspectos, na quarta população de células, as células CD11a + e CD11a– são combinadas em uma razão de 1:50.

[088] Em certos aspectos, uma pluralidade de células NK na referida população expressa um ou mais dos microRNAS dme-miR-7, hsa-let-7a, hsa-let-7c, hsa-let-7e, hsa-let-7g, hsa-miR-103, hsa-miR-106a, hsa-miR-10b, hsa-miR-1183, hsa-miR-124, hsa-miR-1247, hsa-miR-1248, hsa-miR-1255A, hsa-miR-126, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-144, hsa-miR-151-3p, hsa-miR-155, hsa-miR-15a, hsa-miR-16, hsa-miR-17, hsa-miR-181a, hsa-miR-182, hsa-miR-192, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-200a, hsa-miR-20a, hsa-miR-214, hsa-miR-221, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-30b, hsa-miR-30c, hsa-miR-31, hsa-miR-335, hsa-miR-374b, hsa-miR-454, hsa-miR-484, hsa-miR-513C, hsa-miR-516-3p, hsa-miR-520h, hsa-miR-548K, hsa-miR-548P, hsa-miR-600, hsa-miR-641, hsa-miR-643, hsa-miR-874, hsa-miR-875-5p, e hsa-miR-92a-2 em um nível detectavelmente mais alto como células exterminadoras naturais de sangue periférico. Em certos aspectos, uma pluralidade de células NK na referida população expressa um ou mais dos microRNAS miR188-5p, miR-339-5p, miR-19a, miR-34c, miR-18a, miR-500, miR-

22, miR-222, miR-7a, miR-532-3p, miR-223, miR-26b, miR-26a, miR-191, miR-181d, miR-322 e miR342-3p em um nível detectavelmente inferior células exterminadoras naturais. Em certos aspectos, uma pluralidade de células NK na referida população expressa um ou mais dos microRNAS miR-181a, miR-30b e miR30c em um nível equivalente a células exterminadoras naturais de sangue periférico.

[089] Em uma modalidade específica, as referidas células NK são de um único indivíduo, isto é, as referidas células-tronco hemtopoiéticas e progenitoras são de um único indivíduo. Em uma modalidade mais específica, as referidas células NK compreendem células exterminadoras naturais de pelo menos dois indivíduos diferentes, isto é, as referidas células-tronco hemtopoiéticas e progenitoras são de pelo menos dois indivíduos diferentes. Em outra modalidade específica, as referidas células NK são de um indivíduo diferente do indivíduo para o qual o tratamento com as células NK se destina, isto é, as referidas células-tronco hemtopoiéticas e progenitoras são de um indivíduo diferente do indivíduo para quem o tratamento com as células NK é pretendido. Em outra modalidade específica, as referidas células NK foram colocadas em contato ou colocadas em proximidade com um composto imunomodulador ou talidomida em uma quantidade e por um tempo suficiente para as referidas células NK expressarem de forma detectável mais granzima B ou perforina do que um número equivalente de células exterminadoras naturais, isto é , células NK, não contatadas ou colocadas em proximidade com o referido composto imunomodulador ou talidomida. Em outra modalidade específica, uma composição compreendendo as referidas células NK compreende adicionalmente um composto imunomodulador ou talidomida. Em certas modalidades, o composto imunomodulador é um composto descrito abaixo, *por exemplo*, um composto de isoindolina substituído com amino. Em certas

modalidades, o composto imunomodulador é lenalidomida. Em certas modalidades, o composto imunomodulador é pomalidomida.

[090] Em outra modalidade específica, uma composição compreendendo as referidas células NK compreende adicionalmente um ou mais compostos anticâncer, *por exemplo*, um ou mais dos compostos anticâncer descritos abaixo.

[091] Em uma modalidade mais específica, a composição compreende células NK produzidas por um método de três estágios aqui descrito e células exterminadoras naturais de outra fonte, ou preparadas por outro método. Em uma modalidade específica, a referida outra fonte é sangue da placenta e/ou sangue do cordão umbilical. Em outra modalidade específica, a referida outra fonte é sangue periférico. Em modalidades mais específicas, as células NK são combinadas com células exterminadoras naturais de outra fonte, ou feitas por outro método, em uma razão de cerca de 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 ou semelhantes.

[092] Em outra modalidade específica, a composição compreende células NK produzidas usando um método de três estágios aqui descrito e perfusado placentário isolado ou células perfusadas placentárias isoladas. Em uma modalidade mais específica, o referido perfusato placentário é do mesmo indivíduo que as referidas células NK. Em outra modalidade mais específica, o referido perfusato placentário compreende perfusato placentário de um indivíduo diferente das referidas células NK. Em outra modalidade específica, todas ou substancialmente todas (*por exemplo*, mais de 90%, 95%, 98% ou 99%) das células no referido perfusato placentário são células fetais. Em outra

modalidade específica, o perfusato da placenta ou células do perfusato da placenta compreendem células fetais e maternas. Em uma modalidade mais específica, as células fetais no referido perfusato placentário compreendem menos do que cerca de 90%, 80%, 70%, 60% ou 50% das células no referido perfusato. Em outra modalidade específica, o referido perfusato é obtido pela passagem de uma solução de NaCl a 0,9% através da vasculatura placentária. Em outra modalidade específica, o referido perfusato compreende um meio de cultura. Em outra modalidade específica, o referido perfusato foi tratado para remover eritrócitos. Em outra modalidade específica, a referida composição compreende um composto imunomodulador, *por exemplo*, um composto imunomodulador descrito abaixo, *por exemplo*, um composto de isoindolina substituído com amino. Em outra modalidade específica, a composição compreende adicionalmente um ou mais compostos anticâncer, *por exemplo*, um ou mais dos compostos anticâncer descritos abaixo.

[093] Em outra modalidade específica, a composição compreende células NK produzidas usando um método de três estágios aqui descrito e ou células de perfusato placentário. Em uma modalidade mais específica, as referidas células de perfusato placentário são do mesmo indivíduo que as referidas células NK. Em outra modalidade mais específica, as referidas células de perfusato placentário são de um indivíduo diferente das referidas células NK. Em outra modalidade específica, a composição compreende células isoladas de perfusato placentário e células isoladas de perfusato placentário, em que o referido perfusato isolado e as referidas células isoladas de perfusato placentário são de indivíduos diferentes. Em outra modalidade mais específica de qualquer uma das modalidades acima compreendendo perfusato placentário, o referido perfusato placentário compreende perfusato placentário de pelo menos dois indivíduos. Em outra modalidade mais específica de qualquer uma das modalidades acima

compreendendo células de perfusato da placenta, as referidas células de perfusato da placenta isoladas são de pelo menos dois indivíduos. Em outra modalidade específica, a referida composição compreende um composto imunomodulador. Em outra modalidade específica, a composição compreende adicionalmente um ou mais compostos anticâncer, *por exemplo*, um ou mais dos compostos anticâncer descritos abaixo.

[094] Em outro aspecto, é fornecida aqui uma composição, *por exemplo*, uma composição farmacêutica, compreendendo uma população de células NK isolada, *por exemplo*, produzida por qualquer modalidade do método de três estágios aqui descrito. Em uma modalidade específica, a referida população de células NK isolada é produzida a partir de células hematopoiéticas, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras isoladas da placenta, *por exemplo*, de perfusato placentário, sangue do cordão umbilical e/ou sangue periférico. Em outra modalidade específica, a referida população de células NK isolada compreende pelo menos 70% das células na composição. Em outra modalidade específica, a referida população de células NK isolada compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99% das células na composição. Em outra modalidade específica, as referidas células NK compreendem pelo menos 70% das células na composição. Em certas modalidades, pelo menos 80%, 82%, 84%, 86%, 88% ou 90% das células NK na referida composição são $CD3^-$ e $CD56^+$. Em certas modalidades, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88% ou 90% das células NK na referida composição são CD16-. Em certas modalidades, pelo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% ou 60% das células NK na referida composição são CD94 +.

[095] Em outra modalidade específica, as referidas células NK isoladas na referida composição são de um único indivíduo, isto é, as referidas células-tronco hemtopoiéticas e progenitoras são de um único indivíduo. Em uma

modalidade mais específica, as referidas células NK isoladas compreendem células NK de pelo menos dois indivíduos diferentes, isto é, as referidas células-tronco hemtopoiéticas e progenitoras são de pelo menos dois indivíduos diferentes. Em outra modalidade específica, as referidas células NK isoladas na referida composição são de um indivíduo diferente do indivíduo para o qual o tratamento com as células NK se destina, isto é, as referidas células-tronco hemtopoiéticas e progenitoras são de um indivíduo diferente do indivíduo para quem o tratamento com as células NK é pretendido. Em outra modalidade específica, as referidas células NK foram colocadas em contato ou colocadas em proximidade com um composto imunomodulador ou talidomida em uma quantidade e por um tempo suficiente para as referidas células NK expressarem de forma detectável mais granzima B ou perforina do que um número equivalente de células exterminadoras naturais, isto é, células NK, não contatadas ou colocadas em proximidade com o referido composto imunomodulador ou talidomida. Em outra modalidade específica, a referida composição compreende adicionalmente um composto imunomodulador ou talidomida. Em certas modalidades, o composto imunomodulador é um composto descrito abaixo.

[096] Em outra modalidade específica, a composição compreende adicionalmente um ou mais compostos anticâncer, *por exemplo*, um ou mais dos compostos anticâncer descritos abaixo.

[097] Em uma modalidade mais específica, a composição compreende células NK de outra fonte ou preparadas por outro método. Em uma modalidade específica, a referida outra fonte é sangue da placenta e/ou sangue do cordão umbilical. Em outra modalidade específica, a referida outra fonte é sangue periférico. Em modalidades mais específicas, a população de células NK na referida composição é combinada com células NK de outra fonte, ou preparadas

por outro método, em uma razão de cerca de 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 ou semelhantes.

[098] Em outra modalidade específica, a composição compreende uma população de células NK e células de perfusato placentário isoladas ou células de perfusato placentário isoladas. Em uma modalidade mais específica, o referido perfusato placentário é do mesmo indivíduo que a referida população de células NK. Em outra modalidade mais específica, o referido perfusato placentário compreende perfusato placentário de um indivíduo diferente da referida população de células NK. Em outra modalidade específica, todas ou substancialmente todas (*por exemplo*, mais de 90%, 95%, 98% ou 99%) das células no referido perfusato placentário são células fetais. Em outra modalidade específica, o perfusato da placenta ou células do perfusato da placenta compreendem células fetais e maternas. Em uma modalidade mais específica, as células fetais compreendem menos do que cerca de 90%, 80%, 70%, 60% ou 50% das células no referido perfusato placentário. Em outra modalidade específica, o referido perfusato é obtido pela passagem de uma solução de NaCl a 0,9% através da vasculatura placentária. Em outra modalidade específica, o referido perfusato compreende um meio de cultura. Em outra modalidade específica, o referido perfusato foi tratado para remover eritrócitos. Em outra modalidade específica, a referida composição compreende um composto imunomodulador, *por exemplo*, um composto imunomodulador descrito abaixo, *por exemplo*, um composto de isoindolina substituído com amino. Em outra modalidade específica, a composição compreende adicionalmente um ou mais compostos

anticâncer, *por exemplo*, um ou mais dos compostos anticâncer descritos abaixo.

[099] Em outra modalidade específica, a composição compreende uma população de células NK e células perfusadas da placenta. Em uma modalidade mais específica, as referidas células de perfusato placentário são do mesmo indivíduo que a referida população de células NK. Em outra modalidade mais específica, as referidas células de perfusato placentário são de um indivíduo diferente da referida população de células NK. Em outra modalidade específica, a composição compreende células isoladas de perfusato placentário e células isoladas de perfusato placentário, em que o referido perfusato isolado e as referidas células isoladas de perfusato placentário são de indivíduos diferentes. Em outra modalidade mais específica de qualquer uma das modalidades acima compreendendo perfusato placentário, o referido perfusato placentário compreende perfusato placentário de pelo menos dois indivíduos. Em outra modalidade mais específica de qualquer uma das modalidades acima compreendendo células de perfusato da placenta, as referidas células de perfusato da placenta isoladas são de pelo menos dois indivíduos. Em outra modalidade específica, a referida composição compreende um composto imunomodulador. Em outra modalidade específica, a composição compreende adicionalmente um ou mais compostos anticâncer, *por exemplo*, um ou mais dos compostos anticâncer descritos abaixo.

3.1. Terminologia

[0100] Conforme usado neste documento, os termos "composto imunomodulador" e “IMiD™” não abrangem a talidomida.

[0101] Tal como aqui utilizado, "lenalidomida" significa 3- (4'aminoisoindolina-1'-ona) -1-piperidina-2,6-diona (nome do Chemical Abstracts Service) ou 2,6-Piperidinediona, 3- (4-amino- 1,3-di-hidro-1-oxo-2H-isoindol-2-il) - (nome da União Internacional de Química Pura e Aplicada

(IUPAC)). Tal como aqui utilizado, "pomalidomida" significa 4-amino-2- (2,6-dioxopiperidin-3-il) isoindol-1,3-diona.

[0102] Conforme usado neste documento, "multipotente", quando se refere a uma célula, significa que a célula tem a capacidade de se diferenciar em uma célula de outro tipo de célula. Em certas modalidades, "uma célula multipotente" é uma célula que tem a capacidade de crescer em um subconjunto dos aproximadamente 260 tipos de células do corpo dos mamíferos. Ao contrário de uma célula pluripotente, uma célula multipotente não tem a capacidade de formar todos os tipos de células.

[0103] Conforme usado neste documento, "células alimentadoras" se refere a células de um tipo que são co-cultivadas com células de um segundo tipo, para fornecer um ambiente no qual as células do segundo tipo podem ser mantidas e talvez proliferar. Sem ser limitado por qualquer teoria, as células alimentadoras podem fornecer, por exemplo, peptídeos, polipeptídeos, sinais elétricos, moléculas orgânicas (*por exemplo*, esteróides), moléculas de ácido nucleico, fatores de crescimento (*por exemplo*, bFGF), outros fatores (*por exemplo*, citocinas), e nutrientes metabólicos para células-alvo. Em certas modalidades, as células alimentadoras crescem em uma monocamada.

[0104] Conforme usado neste documento, as "células exterminadoras naturais" ou "células NK" produzidas usando os métodos descritos neste documento, sem modificações adicionais, incluem células exterminadoras naturais de qualquer fonte de tecido.

[0105] Conforme usado neste documento, as "células ILC3" produzidas usando os métodos descritos neste documento, sem modificações adicionais, incluem células ILC3 de qualquer fonte de tecido.

[0106] Como usado neste documento, "perfusato placentário" significa solução de perfusão que foi passada através de pelo menos parte de uma

placenta, *por exemplo*, uma placenta humana, *por exemplo*, através da vasculatura placentária e inclui uma pluralidade de células coletadas pela solução de perfusão durante a passagem através a placenta.

[0107] Como usado neste documento, "células de perfusato da placenta" significa células nucleadas, *por exemplo*, células nucleadas totais isoladas, ou isoláveis, de perfusato da placenta.

[0108] Como usado neste documento, "supressão de células tumorais", "supressão de proliferação de células tumorais" e semelhantes, incluem atrasar o crescimento de uma população de células tumorais, *por exemplo*, exterminando uma ou mais das células tumorais na dita população de células tumorais, por exemplo, por contato ou colocando, *por exemplo*, células NK ou uma população de células NK produzida usando um método de três estágios descrito neste documento em proximidade com a população de células tumorais, *por exemplo*, colocando em contato a população de células tumorais com células NK ou uma população de células NK produzida usando um método de três estágios descrito neste documento. Em certas modalidades, o referido contato ocorre *in vitro* ou *ex vivo*. Em outras modalidades, o referido contato ocorre *in vivo.*

[0109] Como usado neste documento, a expressão "células hematopoiéticas" inclui células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras hematopoiéticas.

[0110] Conforme usado neste documento, o "componente indefinido" é um termo da técnica no campo do meio de cultura que se refere a componentes cujos constituintes geralmente não são fornecidos ou quantificados. Exemplos de um "componente indefinido" incluem, sem limitação, soro, por exemplo, soro humano (*por exemplo*, soro humano AB) e soro fetal (*por exemplo*, soro fetal bovino ou soro fetal de bezerro).

[0111] Como usado neste documento, “+”, quando usado para indicar a presença de um marcador celular específico, significa que o marcador celular está detectavelmente presente na seleção de células ativadas por fluorescência sobre um controle de isotipo; ou é detectável acima do fundo em RT-PCR quantitativo ou semiquantitativo.

[0112] Como usado neste documento, "-", quando usado para indicar a presença de um marcador celular específico, significa que o marcador celular não está detectavelmente presente na seleção de células ativadas por fluorescência em um controle de isotipo; ou não é detectável acima do fundo em RT-PCR quantitativo ou semiquantitativo.

4. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0113] A FIG. 1 mostra a expansão de células NK para os compostos CRL1 - CRL11.

[0114] A FIG. 2 mostra a expansão de células NK para os compostos CRL12 - CRL22.

[0115] A FIG. 3 mostra a expansão de células NK em relação ao controle positivo SR1.

[0116] A FIG. 4 mostra a expansão de células CD34 + das quais as células NK foram derivadas.

[0117] A FIG. 5 mostra a citotoxicidade das culturas NK expandidas.

[0118] A FIG. 6 mostra que as células PNK expressam altamente genes que codificam o maquinário citotóxico. FIG. 6A as células CYNK foram combinadas com células NK derivadas de sangue periférico (PB-NK) na razão de 1:1 e a expressão gênica analisada em nível de célula única usando a plataforma 10X Genomics Chromium e sequenciamento Illumina. A análise de bioinformática utilizou o pipeline de análise 10X Genomics Cell Ranger. A análise da transcrição foi restrita a células que expressam Granzyme B (GZMB). FIG. 6B Um gráfico de

tSNE representativo que descreve células PNK e PB-NK como populações distintas. FIG. 6C Gráficos de tSNE de genes associados a células NK selecionados. Os dados são representativos de dois doadores.

[0119] A FIG. 7 mostra que as células PNK e PB-NK expressam diferencialmente genes que codificam receptores de células NK. A expressão de genes de receptores de células NK selecionados analisados por PCR quantitativo em tempo real em células NK de sangue periférico (PB-NK) e células PNK purificadas por grânulos CD11a +. Um nome alternativo indicado acima do histograma para os marcadores selecionados. Os dados representam a média ± SD de três doadores para células CYNK e PBNK (n=3). * $p<0,05$, ** $p<0,005$, *** $p<0,001$.

[0120] A FIG. 8 mostra a estratégia de bloqueio para células PB-NK e CYNK. As células CYNK e PBMC foram descongeladas e coradas com anticorpos acoplados ao fluoróforo direcionados a receptores de células NK. A figura demonstra gráficos de pontos representativos e a estratégia de passagem para a identificação de células CYNK e PB-NK. Veja a FIG. 9 para posterior caracterização das populações.

[0121] A FIG. 9 mostra a expressão diferencial de proteínas de superfície em células CYNK e PB-NK. As células CYNK e PB-NK foram pré-bloqueadas como indicado na FIG. 8.

[0122] A FIG. 10 mostra que as células CYNK formam uma população de células distinta de células PB-NK com base na expressão de proteínas de superfície. Os gráficos tSNE demonstram o agrupamento diferencial de células CYNK e PB-NK com base em seus marcadores de superfície. Gráficos tSNE foram gerados de dados de citometria de fluxo usando o software FlowJo.

5. DESCRIÇÃO DETALHADA

[0123] São fornecidos aqui novos métodos de produção e expansão de

células NK e/ou células ILC3 a partir de células hematopoiéticas, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras. Também são fornecidos aqui métodos, *por exemplo*, métodos de três estágios, de produção de populações de células NK e/ou populações de células ILC3 a partir de células hematopoiéticas, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras. As células hematopoiéticas (*por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas CD34 +) usadas para produzir as células NK e/ou células ILC3, e populações de células NK e/ou populações de células ILC3, podem ser obtidas de qualquer fonte, por exemplo, sem limitação, placenta, umbilical sangue do cordão umbilical, sangue da placenta, sangue periférico, baço ou fígado. Em certas modalidades, as células NK e/ou células ILC3 ou populações de células NK e/ou populações de células ILC3 são produzidas a partir de células hematopoiéticas expandidas, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas e/ou células progenitoras hematopoiéticas. Em uma modalidade, as células hematopoiéticas são coletadas de uma fonte de tais células, *por exemplo*, placenta, por exemplo, de perfusato placentário, sangue do cordão umbilical, sangue da placenta, sangue periférico, baço, fígado (*por exemplo*, fígado fetal) e/ou medula óssea.

[0124] As células hematopoiéticas utilizadas para produzir as células NK e/ou células ILC3, e populações de células NK e/ou populações de células ILC3, podem ser obtidas a partir de qualquer espécie animal. Em certas modalidades, as células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são células de mamíferos. Em modalidades específicas, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são células humanas. Em modalidades específicas, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras são células de primatas. Em modalidades específicas, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são células caninas. Em modalidades específicas, as referidas

células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras são células de roedores.

5.1. Células Hematopoéticas

[0125] As células hematopoiéticas úteis nos métodos aqui divulgados podem ser quaisquer células hematopoiéticas capazes de se diferenciar em células NK e/ou células ILC3, *por exemplo*, células precursoras, células progenitoras hematopoiéticas, células-tronco hematopoiéticas ou semelhantes. As células hematopoiéticas podem ser obtidas a partir de fontes de tecido, tais como, *por exemplo*, medula óssea, sangue do cordão umbilical, sangue da placenta, sangue periférico, fígado ou semelhantes, ou combinações dos mesmos. As células hematopoiéticas podem ser obtidas da placenta. Em uma modalidade específica, as células hematopoiéticas são obtidas a partir do perfusato placentário. Em uma modalidade, as células hematopoiéticas não são obtidas a partir do sangue do cordão umbilical. Em uma modalidade, as células hematopoiéticas não são obtidas do sangue periférico. As células hematopoiéticas do perfusato placentário podem compreender uma mistura de células hematopoiéticas fetais e maternas, *por exemplo*, uma mistura na qual as células maternas constituem mais de 5% do número total de células hematopoiéticas. Em certas modalidades, as células hematopoiéticas do perfusato placentário compreendem pelo menos cerca de 90%, 95%, 98%, 99% ou 99,5% de células fetais.

[0126] Em outra modalidade específica, as células hematopoiéticas, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras, a partir das quais as populações de células NK e/ou populações de células ILC3 produzidas usando um método de três estágios aqui descrito são produzidas, são obtidas a partir de perfusato placentário, cordão umbilical sangue, fígado fetal, sangue periférico mobilizado ou medula óssea. Em outra modalidade específica, as células hematopoiéticas, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas ou

células progenitoras, a partir das quais as populações de células NK e/ou populações de células ILC3 produzidas usando um método de três estágios aqui descrito são produzidas, são células combinadas de perfusato placentário e cordão sangue, *por exemplo*, sangue do cordão da mesma placenta que o perfusato. Em outra modalidade específica, o referido sangue do cordão umbilical é isolado de uma placenta diferente da placenta da qual o referido perfusato placentário é obtido. Em certas modalidades, as células combinadas podem ser obtidas por agrupamento ou combinação do sangue do cordão umbilical e perfusato placentário. Em certas modalidades, o sangue do cordão umbilical e o perfusato placentário são combinados em uma razão de 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 ou semelhantes em volume para obter as células combinadas. Em uma modalidade específica, o sangue do cordão umbilical e o perfusato da placenta são combinados em uma razão de 10:1 a 1:10, de 5:1 a 1:5 ou de 3:1 a 1:3. Em outra modalidade específica, o sangue do cordão umbilical e o perfusato placentário são combinados em uma razão de 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 ou 1:10. Em uma modalidade mais específica, o sangue do cordão umbilical e o perfusato da placenta são combinados em uma razão de 8,5: 1,5 (85%: 15%).

[0127] Em certas modalidades, o sangue do cordão umbilical e o perfusato placentário são combinados em uma razão de 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15,

1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 ou semelhantes pelo teor de células nucleadas totais (TNC) para obter as células combinadas. Em uma modalidade específica, o sangue do cordão umbilical e o perfusato da placenta são combinados em uma razão de 10:1 a 10:1, de 5:1 a 1:5 ou de 3:1 a 1:3. Em outra modalidade específica, o sangue do cordão umbilical e o perfusato placentário são combinados em uma razão de 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 ou 1:10.

[0128] Em outra modalidade específica, as células hematopoiéticas, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras a partir das quais as referidas populações de células NK e/ou populações de células ILC3 produzidas usando um método de três estágios aqui descrito são produzidas, são de sangue do cordão umbilical e perfusato placentário, mas em que o referido sangue do cordão umbilical é isolado de uma placenta diferente da placenta da qual o referido perfusato placentário é obtido.

[0129] Em certas modalidades, as células hematopoiéticas são células $CD34^+$. Em modalidades específicas, as células hematopoiéticas úteis nos métodos aqui divulgados são $CD34^+CD38^+$ ou $CD34^+CD38^-$. Em uma modalidade mais específica, as células hematopoiéticas são $CD34^+CD38^-Lin^-$. Em outra modalidade específica, as células hematopoiéticas são uma ou mais de $CD2^-$, $CD3^-$, $CD11b^-$, $CD11c^-$, $CD14^-$, $CD16^-$, $CD19^-$, $CD24^-$, $CD56^-$, $CD66b^-$ e/ou glicoforina A^-. Em outra modalidade específica, as células hematopoiéticas são $CD2^-$, $CD3^-$, $CD11b^-$, $CD11c^-$, $CD14^-$, $CD16^-$, $CD19^-$, $CD24^-$, $CD56^-$, $CD66b^-$ e glicoforina A^-. Em outra modalidade mais específica, as células hematopoiéticas são $CD34^+CD38^-CD33^-CD117^-$. Em outra modalidade mais específica, as células hematopoiéticas são $CD34^+CD38^-CD33^-CD117^-CD235^-CD36^-$.

[0130] Em outra modalidade, as células hematopoiéticas são $CD45^+$. Em outra modalidade específica, as células hematopoiéticas são $CD34^+CD45^+$. Em

outra modalidade, a célula hematopoiética é Thy-1$^+$. Em uma modalidade específica, a célula hematopoiética é CD34$^+$Thy-1$^+$. Em outra modalidade, as células hematopoiéticas são CD133$^+$. Em modalidades específicas, as células hematopoiéticas são CD34$^+$CD133$^+$ ou CD133$^+$Thy-1$^+$. Em outra modalidade específica, as células hematopoiéticas CD34$^+$ são CXCR4$^+$. Em outra modalidade específica, as células hematopoiéticas CD34$^+$ são CXCR4$^-$. Em outra modalidade, as células hematopoiéticas são positivas para KDR (receptor do fator de crescimento vascular 2). Em modalidades específicas, as células hematopoiéticas são CD34$^+$KDR$^+$, CD133$^+$KDR$^+$ ou Thy-1$^+$KDR$^+$. Em certas outras modalidades, as células hematopoiéticas são positivas para aldeído desidrogenase (ALDH$^+$), *por exemplo*, as células são CD34$^+$ALDH$^+$.

[0131] Em certas outras modalidades, as células CD34$^+$ são CD45$^-$. Em modalidades específicas, as células CD34$^+$, *por exemplo*, CD34$^+$, células CD45$^-$ expressam um ou mais, ou todos, os miRNAs hsa-miR-380, hsa-miR-512, hsa-miR-517, hsa-miR-518c, hsa-miR-519b, hsa-miR-520a, hsa-miR-337, hsa-miR-422a, hsa-miR-549 e/ou hsa-miR-618.

[0132] Em certas modalidades, as células hematopoiéticas são CD34$^-$.

[0133] As células hematopoiéticas também podem carecer de certos marcadores que indicam comprometimento com a linhagem ou falta de ingenuidade no desenvolvimento. Por exemplo, em outra modalidade, as células hematopoiéticas são HLA-DR$^-$. Em modalidades específicas, as células hematopoiéticas são CD34$^+$HLA-DR$^-$, CD133$^+$HLA-DR$^-$, Thy-1$^+$HLA-DR$^-$ ou ALDH$^+$HLA-DR$^-$ Em outra modalidade, as células hematopoiéticas são negativas para um ou mais, ou todos, os marcadores de linhagem CD2, CD3, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b e glicoforina A.

[0134] Assim, as células hematopoiéticas podem ser selecionadas para uso nos métodos aqui divulgados com base na presença de marcadores que indicam

um estado indiferenciado ou com base na ausência de marcadores de linhagem indicando que pelo menos alguma diferenciação de linhagem ocorreu. Métodos de isolamento de células, incluindo células hematopoiéticas, com base na presença ou ausência de marcadores específicos são discutidos em detalhes abaixo.

[0135] As células hematopoiéticas utilizadas nos métodos fornecidos neste documento podem ser uma população substancialmente homogênea, *por exemplo*, uma população que compreende pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 98% ou pelo menos cerca de 99% de células hematopoiéticas de uma única fonte de tecido, ou uma população que compreende células hematopoiéticas exibindo os mesmos marcadores celulares associados às células hematopoiéticas. Por exemplo, em várias modalidades, as células hematopoiéticas podem compreender pelo menos cerca de 95%, 98% ou 99% de células hematopoiéticas da medula óssea, sangue do cordão umbilical, sangue da placenta, sangue periférico ou placenta, *por exemplo*, perfusato placentário.

[0136] As células hematopoiéticas usadas nos métodos fornecidos neste documento podem ser obtidas de um único indivíduo, *por exemplo*, de uma única placenta, ou de uma pluralidade de indivíduos, *por exemplo*, podem ser agrupadas. Quando as células hematopoiéticas são obtidas a partir de uma pluralidade de indivíduos e agrupadas, as células hematopoiéticas podem ser obtidas a partir da mesma fonte de tecido. Assim, em várias modalidades, as células hematopoiéticas reunidas são todas da placenta, *por exemplo*, perfusato placentário, todas do sangue da placenta, todas do sangue do cordão umbilical, todas do sangue periférico e semelhantes.

[0137] As células hematopoiéticas utilizadas nos métodos aqui divulgados podem, em certas modalidades, compreender células hematopoiéticas de duas

ou mais fontes de tecido. Por exemplo, em certas modalidades, quando as células hematopoiéticas de duas ou mais fontes são combinadas para uso nos métodos aqui, uma pluralidade de células hematopoiéticas usadas para produzir células exterminadoras naturais usando um método de três estágios aqui descrito compreende células hematopoiéticas da placenta, *por exemplo*, perfusato placentário. Em várias modalidades, as células hematopoiéticas usadas para produzir populações de células NK e/ou populações de células ILC3 produzidas usando um método de três estágios aqui descrito, compreendem células hematopoiéticas da placenta e do sangue do cordão umbilical; da placenta e sangue periférico; da placenta e do sangue da placenta, ou da placenta e da medula óssea. Em uma modalidade, as células hematopoiéticas compreendem células hematopoiéticas do perfusato placentário em combinação com células hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical, em que o sangue do cordão e a placenta são do mesmo indivíduo, *ou seja*, em que o sangue do perfusato e do cordão são combinados. Em modalidades em que as células hematopoiéticas compreendem células hematopoiéticas de duas fontes de tecido, as células hematopoiéticas das fontes podem ser combinadas em uma razão de, por exemplo, 1:10, 2:9, 3:8, 4:7:, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 ou 9:1.

5.1.1. Células-tronco Hematopoéticas da Placenta

[0138] Em certas modalidades, as células hematopoiéticas utilizadas nos métodos aqui fornecidos são células hematopoiéticas da placenta. Em uma modalidade, as células hematopoiéticas da placenta são $CD34^{+}$. Em uma modalidade específica, as células hematopoéticas da placenta são predominantemente (*por exemplo*, pelo menos cerca de 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 98%) células $CD34^{+}CD38^{-}$. Em outra modalidade específica, as células hematopoéticas da placenta são

predominantemente (*por exemplo*, pelo menos cerca de 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 98%) células $CD34^+CD38^+$. As células hematopoiéticas da placenta podem ser obtidas a partir da placenta de um mamífero pós-parto (*por exemplo*, humano) por qualquer meio conhecido pelos versados na técnica, *por exemplo*, por perfusão.

[0139] Em outra modalidade, a célula hematopoiética da placenta é $CD45^-$. Em uma modalidade específica, a célula hematopoiética é $CD34^+CD45^-$. Em outra modalidade específica, as células hematopoiéticas da placenta são $CD34^+CD45^+$.

5.2. Produção de células exterminadoras naturais e/ou células ILC3 e células exterminadoras naturais e/ou populações de células ILC3

[0140] A produção de células NK e/ou células ILC3 e células NK e/ou populações de células ILC3 pelos presentes métodos compreende a expansão de uma população de células hematopoiéticas. Durante a expansão celular, uma pluralidade de células hematopoiéticas dentro da população de células hematopoiéticas se diferencia em células NK e/ou células ILC3. Em um aspecto, é fornecido aqui um método de produção de células NK compreendendo a cultura de células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras, *por exemplo*, células-tronco $CD34^+$ ou células progenitoras, em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células, subsequentemente cultivando a referida primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células e, subsequentemente, cultivando a referida segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem um agente de mobilização de células-tronco e LMWH, para produzir uma terceira população de células, em

que a terceira população de células compreende células exterminadoras que são CD56 +, CD3-, e em que pelo menos 70%, por exemplo, pelo menos 80%, das células exterminadoras naturais são viáveis. Em certas modalidades, essas células exterminadoras naturais compreendem células exterminadoras naturais que são CD16-. Em certas modalidades, essas células exterminadoras naturais compreendem células exterminadoras naturais que são CD94+. Em certas modalidades, essas células exterminadoras naturais compreendem células exterminadoras naturais que são CD94+ ou CD16+. Em certas modalidades, essas células exterminadoras naturais compreendem células exterminadoras naturais que são CD94- ou CD16-. Em certas modalidades, essas células exterminadoras naturais compreendem células exterminadoras naturais que são CD94+ e CD16+. Em certas modalidades, essas células exterminadoras naturais compreendem células exterminadoras naturais que são CD94- e CD16-. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[0141] Em um aspecto, é fornecido aqui um método de produção de células NK compreendendo (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15

(IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem LMWH, para produzir uma terceira população de células; em que a terceira população de células compreende células exterminadoras naturais que são CD56 +, CD3- e CD11a +. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[0142] Em um aspecto, é fornecido aqui um método de produção de células NK compreendendo (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e não tem cada um do fator de célula-tronco (SCF) e LMWH, para produzir uma terceira população de células; em que a terceira população de células compreende células exterminadoras naturais que são CD56+, CD3- e CD11a+. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem

LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[0143] Em um aspecto, é fornecido aqui um método de produção de células NK compreendendo (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e não tem cada um de SCF, um agente de mobilização de célula-tronco, e LMWH, para produzir uma terceira população de células; em que a terceira população de células compreende células exterminadoras naturais que são CD56 +, CD3- e CD11a +. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[0144] Em um aspecto, é fornecido aqui um método de produção de células NK compreendendo (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras

em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e que não tem cada de um agente de mobilização de célula-tronco, e LMWH, para produzir uma terceira população de células; e (d) isolar células CD11a+ da terceira população de células; em que a quarta população de células compreende células exterminadoras naturais que são CD56 +, CD3- e CD11a. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[0145] Em certas modalidades, de qualquer uma das modalidades anteriores, as referidas células exterminadoras naturais expressam perforina e EOMES. Em certas modalidades, as referidas células exterminadoras naturais não expressam RORγt ou IL1R1.

[0146] Em um aspecto, é fornecido aqui um método de produção de células ILC3 compreendendo (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio

compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem LMWH, para produzir uma terceira população de células; em que a terceira população de células compreende células ILC3 que são CD56+, CD3- e CD11a-. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[0147] Em um aspecto, é fornecido aqui um método de produção de células ILC3 compreendendo (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo um agente de mobilização de célula-tronco, IL-2 e IL-15, e sem LMWH, para produzir uma terceira população de células; em que a terceira população de células compreende células ILC3 que são CD56+, CD3- e CD11a-. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-

1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[0148] Em um aspecto, é fornecido aqui um método de produção de células ILC3 compreendendo (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo SCF, IL-2 e IL-15, e sem LMWH, para produzir uma terceira população de células; em que a terceira população de células compreende células ILC3 que são CD56+, CD3- e CD11a-. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[0149] Em um aspecto, é fornecido aqui um método de produção de células ILC3 compreendendo (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou

progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo um agente de mobilização de célula-tronco, IL-2 e IL-15, e sem LMWH, para produzir uma terceira população de células; em que a terceira população de células compreende células ILC3 que são CD56+, CD3- e CD11a-. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[0150] Em um aspecto, é fornecido aqui um método de produção de células ILC3 compreendendo (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e que não tem cada de um agente de mobilização de célula-tronco, e LMWH, para produzir uma terceira população de células; e (d) isolar células CD11a-, ou

remover células CD11a+ da terceira população de células; em que a quarta população de células compreende células ILC3 que são CD56 +, CD3- e CD11a. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[0151] Em certas modalidades, as referidas células ILC3 expressam RORγt e IL1R1. Em certas modalidades, as referidas células ILC3 não expressam perforina ou EOMES.

5.2.1. Produção de Populações de Células NK e/ou Células ILC3 usando um Método de Três Estágios

[0152] Em uma modalidade, é fornecido aqui um método de três estágios de produção de populações de células NK e/ou de células ILC3. Em certas modalidades, o método de expansão e diferenciação das células hematopoiéticas, como aqui descrito, para produzir populações de células NK e/ou células ILC3 de acordo com um método de três estágios aqui descrito compreende manter a população de células compreendendo as referidas células hematopoiéticas entre cerca de 2×10^4 e cerca de 6×10^6 células por mililitro. Em certos aspectos, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são inicialmente inoculadas no referido primeiro meio de 1×10^4 a 1×10^5 células/mL. Em um aspecto específico, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são inicialmente inoculadas no referido primeiro meio a cerca de 3×10^4 células/mL.

[0153] Em certos aspectos, a referida primeira população de células é inicialmente inoculada no referido segundo meio de 5 x 10^4 a 5 x 10^5 células/mL. Em um aspecto específico, a referida primeira população de células é inicialmente inoculada no referido segundo meio a cerca de 1 x 10^5 células/mL.

[0154] Em certos aspectos, a referida segunda população de células é inicialmente inoculada no referido terceiro meio de 1 x 10^5 a 5 x 10^6 células/mL. Em certos aspectos, a referida segunda população de células é inicialmente inoculada no referido terceiro meio de 1 x 10^5 a 1 x 10^6 células/mL. Em um aspecto específico, a referida segunda população de células é inicialmente inoculada no referido terceiro meio a cerca de 5 x 10^5 células/mL. Em um aspecto mais específico, a referida segunda população de células é inicialmente inoculada no referido terceiro meio a cerca de 5 x 10^5 células/mL em um frasco giratório. Em um aspecto específico, a referida segunda população de células é inicialmente inoculada no referido terceiro meio a cerca de 3 x 10^5 células/mL. Em um aspecto mais específico, a referida segunda população de células é inicialmente inoculada no referido terceiro meio a cerca de 3 x 10^5 células/mL em uma cultura estática.

[0155] Em uma determinada modalidade, o método de três estágios compreende um primeiro estágio ("estágio 1") compreendendo a cultura de células-tronco hematopoéticas ou células progenitoras, *por exemplo*, células-tronco $CD34^+$ ou células progenitoras, em um primeiro meio por um período de tempo especificado, *por exemplo*, como aqui descrito, para produzir uma primeira população de células. Em certas modalidades, o primeiro meio compreende um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo). Em certas modalidades, o primeiro meio compreende, além de um agente de mobilização de células-tronco e Tpo, um ou mais de LMWH, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF e GM-CSF. Em uma modalidade específica, o primeiro meio

compreende, além de um agente de mobilização de células-tronco e Tpo, cada um de LMWH, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF e GM-CSF. Em uma modalidade específica, o primeiro meio não tem LMWH adicionado. Em uma modalidade específica, o primeiro meio não tem glicosaminoglicanas dessulfatadas adicionadas. Em uma modalidade específica, o primeiro meio não tem LMWH. Em uma modalidade específica, o primeiro meio não tem glicosaminoglicanas dessulfatadas. Em uma modalidade específica, além de um agente de mobilização de células-tronco e Tpo, cada um de Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF e GM-CSF. Em modalidades específicas, o primeiro meio não tem fator de inibição de leucemia (LIF), proteína inibidora de macrófagos-1alfa (MIP-1α) ou ambos.

[0156] Em certas modalidades, subsequentemente, no "estágio 2", as referidas células são cultivadas em um segundo meio por um período de tempo especificado, *por exemplo*, como aqui descrito, para produzir uma segunda população de células. Em certas modalidades, o segundo meio compreende um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15) e não tem Tpo. Em certas modalidades, o segundo meio compreende, além de um agente de mobilização de células-tronco e IL-15, um ou mais de LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF e GM-CSF. Em certas modalidades, o segundo meio compreende, além de um agente de mobilização de células-tronco e IL-15, cada um de LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF e GM-CSF. Em uma modalidade específica, o segundo meio não tem LMWH adicionado. Em uma modalidade específica, o segundo meio não tem glicosaminoglicanas dessulfatadas adicionadas. Em uma modalidade específica, o segundo meio não tem heparina, *por exemplo*, LMWH. Em uma modalidade específica, o segundo meio não tem glicosaminoglicanas dessulfatadas. Em certas modalidades, o segundo meio compreende, além de um agente de mobilização de células-tronco e IL-15, cada um de Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF e GM-CSF. Em modalidades específicas, o segundo meio não tem

fator de inibição de leucemia (LIF), proteína inibidora de macrófagos-1alfa (MIP-1α) ou ambos.

[0157] Em certas modalidades, subsequentemente, no "estágio 3", as referidas células são cultivadas em um terceiro meio por um período de tempo especificado, *por exemplo*, conforme descrito neste documento, para produzir uma terceira população de células, *por exemplo*, células exterminadoras naturais. Em certas modalidades, o terceiro meio compreende IL-2 e IL-15 e não tem um agente de mobilização de células-tronco e LMWH. Em certas modalidades, o terceiro meio compreende, além de IL-2 e IL-15, um ou mais de SCF, IL-6, IL-7, G-CSF e GM-CSF. Em certas modalidades, o terceiro meio compreende, além de IL-2 e IL-15, cada um de SCF, IL-6, IL-7, G-CSF e GM-CSF. Em modalidades específicas, o primeiro meio não tem um, dois ou todos os três de LIF, MIP-1α e Flt3L. Em modalidades específicas, o terceiro meio não tem glicosaminoglicanas dessulfatadas adicionadas. Em modalidades específicas, o terceiro meio não tem glicosaminoglicanas dessulfatadas. Em modalidades específicas, o terceiro meio não tem heparina, *por exemplo*, LMWH.

[0158] Em uma modalidade específica, o método de três estágios é usado para produzir populações de células NK e/ou células ILC3. Em certas modalidades, o método de três estágios é conduzido na ausência de suporte de célula alimentadora do estroma. Em certas modalidades, o método de três estágios é conduzido na ausência de esteroides adicionados exogenamente (*por exemplo*, cortisona, hidrocortisona ou seus derivados).

[0159] Em certos aspectos, o referido primeiro meio usado no método de três estágios compreende um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo). Em certos aspectos, o primeiro meio usado no método de três estágios compreende, além de um agente de mobilização de células-tronco e Tpo, um ou mais de Heparina de Baixo Peso Molecular (LMWH), Ligante Flt-3

(Flt-3L), fator de célula-tronco (SCF), IL-6, IL-7, fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) ou fator estimulador de granulócitos-macrófagos (GM-CSF). Em certos aspectos, o primeiro meio usado no método de três estágios compreende, além de um agente de mobilização de células-tronco e Tpo, cada um de LMWH, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF e GM- CSF. Em certos aspectos, o primeiro meio usado no método de três estágios compreende, além de um agente de mobilização de células-tronco e Tpo, cada um de Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF e GM- CSF. Em um aspecto específico, o primeiro meio não tem LMWH adicionado. Em um aspecto específico, o primeiro meio não tem glicosaminoglicanas dessulfatadas adicionadas. Em um aspecto específico, o primeiro meio não tem LMWH. Em um aspecto específico, o primeiro meio não tem glicosaminoglicanas dessulfatadas. Em certos aspectos, o referido Tpo está presente no primeiro meio a uma concentração de 1 ng/mL a 100 ng/mL, de 1 ng/mL a 50 ng/mL, de 20 ng/mL a 30 ng/mL, ou cerca de 25 ng/mL. Em outros aspectos, o referido Tpo está presente no primeiro meio a uma concentração de 100 ng/mL a 500 ng/mL, de 200 ng/mL a 300 ng/mL ou cerca de 250 ng/mL. Em certos aspectos, quando LMWH está presente no primeiro meio, o LMWH está presente em uma concentração de 1U/mL a 10U/mL; o Flt-3L está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,01 ng/mL a 0,1 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,01 ng/mL a 0,50 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,1 ng/mL. Em certos aspectos, no primeiro meio, o Flt-3L está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,01 ng/mL a 0,1 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 1

ng/mL a 50 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,01 ng/mL a 0,50 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,1 ng/mL. Em certos aspectos, quando LMWH está presente no primeiro meio, o LMWH está presente em uma concentração de 4U/mL a 5U/ mL; o Flt-3L está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,04 ng/mL a 0,06 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,20 ng/mL a 0,30 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,5 ng/mL. Em certos aspectos, no primeiro meio, o Flt-3L está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,04 ng/mL a 0,06 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,20 ng/mL a 0,30 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,5 ng/mL. Em certos aspectos, quando LMWH está presente no primeiro meio, o LMWH está presente em uma concentração de cerca de 4,5U/mL; o Flt-3L está presente em uma concentração de cerca de 25 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de cerca de 27 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de cerca de 0,05 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de cerca de 25 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de cerca de.25 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de cerca de 0,01 ng/mL. Em certos aspectos, no primeiro meio, o Flt-3L está presente a uma concentração de cerca de 25 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de cerca de 27 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de cerca de 0,05 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de cerca de 25 ng/mL; o G-CSF está presente em uma

concentração de cerca de.25 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de cerca de 0,01 ng/mL. Em certas modalidades, o referido primeiro meio compreende adicionalmente um ou mais dos seguintes: antibióticos, como gentamicina; antioxidantes, tais como transferrina, insulina e/ou beta-mercaptoetanol; selenito de sódio; ácido ascórbico; etanolamina; e glutationa. Em certas modalidades, o meio que fornece a base para o primeiro meio é um meio de cultura de células/tecidos conhecido pelos versados na técnica, *por exemplo*, um meio de cultura de células/tecidos disponível comercialmente, como SCGM™, STEMMACS™, GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM:Ham's F12 ("F12") (*por exemplo*, razão de 2:1, ou alta glicose ou baixa glicose DMEM), Avançado DMEM (Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM e/ou RPMI-1640; ou é um meio que compreende componentes geralmente incluídos em meios de cultura de células/tecidos conhecidos, tais como os componentes incluídos em GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM:Ham's F12 ("F12") (*por exemplo*, razão de 2:1, ou alta glicose ou baixa glicose DMEM), DMEM avançado (Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM e/ou RPMI-1640. Em certas modalidades, o referido primeiro meio não é GBGM®. Em modalidades específicas de qualquer uma das modalidades anteriores, o primeiro meio não tem LIF, MIP-1α ou ambos.

[0160] Em certos aspectos, o referido segundo meio usado no método de três estágios compreende um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15) e não tem Tpo. Em certos aspectos, o segundo meio usado no método de três estágios compreende, além de um agente de mobilização de células-tronco e IL-15, um ou mais de LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G -CSF e GM-CSF. Em certos aspectos, o segundo meio usado no método de três estágios

compreende, além de um agente de mobilização de células-tronco e IL-15, cada um de LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF e GM-CSF. Em certos aspectos, o segundo meio usado no método de três estágios compreende, além de um agente de mobilização de células-tronco e IL-15, cada um de Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G -CSF e GM-CSF. Em um aspecto específico, o segundo meio não tem LMWH adicionado. Em um aspecto específico, o segundo meio não tem glicosaminoglicanas dessulfatadas adicionadas. Em um aspecto específico, o segundo meio não tem LMWH. Em um aspecto específico, o segundo meio não tem glicosaminoglicanas dessulfatadas. Em certos aspectos, a referida IL-15 está presente no referido segundo meio a uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL, de 10 ng/mL a 30 ng/mL ou cerca de 20 ng/mL. Em certos aspectos, quando LMWH está presente no referido segundo meio, o LMWH está presente em uma concentração de 1U/mL a 10U/mL; o Flt-3L está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,01 ng/mL a 0,1 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,01 ng/mL a 0,50 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,1 ng/mL. Em certos aspectos, no referido segundo meio, o Flt-3L está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,01 ng/mL a 0,1 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,01 ng/mL a 0,50 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,1 ng/mL. Em certos aspectos, quando LMWH está presente no segundo meio, o LMWH está presente no segundo meio a uma concentração de 4U/mL a 5U/ mL; o Flt-3L está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o SCF está presente em uma

concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,04 ng/mL a 0,06 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,20 ng/mL a 0,30 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,5 ng/mL. Em certos aspectos, no segundo meio, o Flt-3L está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,04 ng/mL a 0,06 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,20 ng/mL a 0,30 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,5 ng/mL. Em certos aspectos, quando LMWH está presente no segundo meio, o LMWH está presente no segundo meio a uma concentração de 4U/mL a 5U/ mL; o Flt-3L está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,04 ng/mL a 0,06 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,20 ng/mL a 0,30 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,5 ng/mL. Em certos aspectos, no segundo meio, o Flt-3L está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,04 ng/mL a 0,06 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,20 ng/mL a 0,30 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,5 ng/mL. Em certos aspectos, quando LMWH está presente no segundo meio, o LMWH está presente no segundo meio em uma concentração de cerca de 4,5U/mL; o Flt-3L está presente em uma concentração de cerca de 25 ng/mL; o SCF está presente em uma

concentração de cerca de 27 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de cerca de 0,05 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de cerca de 25 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de cerca de 0,25 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de cerca de 0,01 ng/mL. Em certos aspectos, no segundo meio, o Flt-3L está presente a uma concentração de cerca de 25 ng/mL; o SCF está presente em uma concentração de cerca de 27 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de cerca de 0,05 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de cerca de 25 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de cerca de 0,25 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de cerca de 0,01 ng/mL. Em certas modalidades, o referido segundo meio compreende adicionalmente um ou mais dos seguintes: antibióticos, como gentamicina; antioxidantes, tais como transferrina, insulina e/ou beta-mercaptoetanol; selenito de sódio; ácido ascórbico; etanolamina; e glutationa. Em certas modalidades, o meio que fornece a base para o segundo meio é um meio de cultura de células/tecidos conhecido pelos versados na técnica, *por exemplo*, um meio de cultura de células/tecidos disponível comercialmente, como SCGM™, STEMMACS™, GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM:Ham's F12 ("F12") (*por exemplo*, razão de 2:1, ou alta glicose ou baixa glicose DMEM), Avançado DMEM (Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM e/ou RPMI-1640; ou é um meio que compreende componentes geralmente incluídos em meios de cultura de células/tecidos conhecidos, tais como os componentes incluídos em GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM:Ham's F12 ("F12") (*por exemplo*, razão de 2:1, ou alta glicose ou baixa glicose DMEM), DMEM avançado (Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM e/ou RPMI-1640. Em certas modalidades, o referido segundo meio não é GBGM®. Em modalidades

específicas de qualquer uma das modalidades anteriores, o primeiro meio não tem LIF, MIP-1α ou ambos.

[0161] Em certos aspectos, o referido terceiro meio usado no método de três estágios compreende IL-2 e IL-15 e não tem um agente de mobilização de células-tronco e LMWH. Em certos aspectos, o referido terceiro meio usado no método de três estágios compreende IL-2 e IL-15 e não tem LMWH. Em certos aspectos, o referido terceiro meio usado no método de três estágios compreende IL-2 e IL-15 e não tem SCF e LMWH. Em certos aspectos, o referido terceiro meio usado no método de três estágios compreende IL-2 e IL-15 e não tem SCF, um agente de mobilização de células-tronco e LMWH. Em certos aspectos, o referido terceiro meio usado no método de três estágios compreende um agente de mobilização de célula-tronco, IL-2 e IL-15 e não tem LMWH. Em certos aspectos, o referido terceiro meio usado no método de três estágios compreende SCF, IL-2 e IL-15 e não tem LMWH. Em certos aspectos, o referido terceiro meio usado no método de três estágios compreende um agente de mobilização de célula-tronco, SCF, IL-2 e IL-15 e não tem LMWH. Em certos aspectos, o referido terceiro meio usado no método de três estágios compreende IL-2 e IL-15 e não tem um agente de mobilização de células-tronco e LMWH. Em certos aspectos, o terceiro meio usado no método de três estágios compreende, além de IL-2 e IL-15, um ou mais de SCF, IL-6, IL-7, G-CSF ou GM-CSF. Em certos aspectos, o terceiro meio usado no método de três estágios compreende, além de IL-2 e IL-15, cada um de SCF, IL-6, IL-7, G-CSF e GM-CSF. Em certos aspectos, a referida IL-2 está presente no referido terceiro meio a uma concentração de 10 U/mL a 10.000 U/mL e a referida IL-15 está presente no referido terceiro meio a uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL. Em certos aspectos, a referida IL-2 está presente no referido terceiro meio a uma concentração de 100 U/mL a 10.000 U/mL e a referida IL-15 está presente no

referido terceiro meio a uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL. Em certos aspectos, a referida IL-2 está presente no referido terceiro meio a uma concentração de 300 U/mL a 3.000 U/mL e a referida IL-15 está presente no referido terceiro meio a uma concentração de 10 ng/mL a 30 ng/mL. Em certos aspectos, a referida IL-2 está presente no referido terceiro meio a uma concentração de cerca de 1.000 U/mL e a referida IL-15 está presente no referido terceiro meio a uma concentração de cerca de 20 ng/mL. Em certos aspectos, no referido terceiro meio, o SCF está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,01 ng/mL a 0,1 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,01 ng/mL a 0,50 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,1 ng/mL. Em certos aspectos, no referido terceiro meio, o SCF está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de 0,04 ng/mL a 0,06 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de 0,20 ng/mL a 0,30 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de 0,005 ng/mL a 0,5 ng/mL. Em certos aspectos, no referido terceiro meio, o SCF está presente em uma concentração de cerca de 22 ng/mL; a IL-6 está presente em uma concentração de cerca de 0,05 ng/mL; a IL-7 está presente em uma concentração de cerca de 20 ng/mL; o G-CSF está presente em uma concentração de cerca de 0,25 ng/mL; e o GM-CSF está presente em uma concentração de cerca de 0,01 ng/mL. Em certos aspectos, o terceiro meio compreende 100 ng/mL de IL-7, 1.000 ng/mL de IL-2, 20 ng/mL de IL-15 e 10 agente de mobilização de células-tronco e não tem SCF. Em certos aspectos, o terceiro meio compreende 20 ng/mL de IL-7, 1.000 ng/mL de IL-2, 20 ng/mL de IL-15 e agente de mobilização de células-tronco e não tem SCF. Em certos aspectos, o terceiro meio compreende 20 ng/mL de IL-

7, 20 ng/mL de IL-15 e agente de mobilização de células-tronco e não tem SCF. Em certos aspectos, o terceiro meio compreende 100 ng/mL de IL-7, 22 ng/mL de SCF, 1.000 ng/mL de IL-2 e 20 ng/mL de IL-15 e não tem agente de mobilização de células-tronco. Em certos aspectos, o terceiro meio compreende 22 ng/mL de SCF, 1.000 ng/mL de IL-2 e 20 ng/mL de IL-15 e não tem agente de mobilização de células-tronco. Em certos aspectos, o terceiro meio compreende 20 ng/mL de IL-7, 22 ng/mL de SCF, 1.000 ng/mL de IL-2 e 20 ng/mL de IL-15 e não tem agente de mobilização de células-tronco. Em certos aspectos, o terceiro meio compreende 20 ng/mL de IL-7, 22 ng/mL de SCF e 1.000 ng/mL de IL-2 e não tem agente de mobilização de células-tronco. Em modalidades específicas de qualquer uma das modalidades anteriores, o primeiro meio não tem um, dois ou todos os três de LIF, MIP-1α, Flt-3L.

[0162] Em certas modalidades, o referido terceiro meio compreende adicionalmente um ou mais dos seguintes: antibióticos, como gentamicina; antioxidantes, tais como transferrina, insulina e/ou beta-mercaptoetanol; selenito de sódio; ácido ascórbico; etanolamina; e glutationa. Em certas modalidades, o meio que fornece a base para o terceiro meio é um meio de cultura de células/tecidos conhecido pelos versados na técnica, *por exemplo*, um meio de cultura de células/tecidos disponível comercialmente, como SCGM™, STEMMACS™, GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM:Ham's F12 ("F12") (*por exemplo*, razão de 2:1, ou alta glicose ou baixa glicose DMEM), Avançado DMEM (Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM e/ou RPMI-1640; ou é um meio que compreende componentes geralmente incluídos em meios de cultura de células/tecidos conhecidos, tais como os componentes incluídos em GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM:Ham's F12 ("F12") (*por exemplo*, razão de 2:1, ou alta

glicose ou baixa glicose DMEM), DMEM avançado (Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM e/ou RPMI-1640. Em certas modalidades, o referido terceiro meio não é GBGM®.

[0163] Geralmente, os componentes do meio particularmente citados não se referem a possíveis constituintes em um componente indefinido do referido meio. Por exemplo, o referido Tpo, IL-2 e IL-15 não estão incluídos em um componente indefinido do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio, *por exemplo*, o referido Tpo, IL-2 e IL-15 não estão incluídos no soro. Além disso, o referido LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF e/ou GM-CSF não estão compreendidos dentro de um componente indefinido do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio, *por exemplo*, o referido LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF e/ou GM-CSF não estão incluídos no soro.

[0164] Em certos aspectos, o referido primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende soro AB humano. Em certos aspectos, qualquer um do referido primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende 1% a 20% de soro-AB humano, 5% a 15% de soro-AB humano ou cerca de 2, 5 ou 10% de soro-AB humano.

[0165] Em certas modalidades, nos métodos de três estágios descritos neste documento, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são cultivadas no referido primeiro meio para 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 dias. Em certas modalidades, nos métodos de três estágios descritos neste documento, as células são cultivadas no referido segundo meio para 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 dias. Em certas modalidades, nos métodos de três estágios descritos aqui, as células são cultivadas no referido terceiro meio por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 dias, ou por mais de 30 dias.

[0166] Em uma modalidade específica, nos métodos de três estágios descritos neste documento, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são cultivadas no referido primeiro meio por 7-13 dias para produzir uma primeira população de células, antes da referida cultura no referido segundo meio; a referida primeira população de células é cultivada no referido segundo meio durante 2-6 dias para produzir uma segunda população de célula antes da referida cultura no referido meio; e a referida segunda população de células é cultivada no referido terceiro meio durante 10-30 dias, isto é, as células são cultivadas em um total de 19-49 dias.

[0167] Em uma modalidade, nos métodos de três estágios descritos neste documento, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são cultivadas no referido primeiro meio durante 8-12 dias para produzir uma primeira população de células antes da referida cultura no referido segundo meio; a referida primeira população de células é cultivada no referido segundo meio durante 3-5 dias para produzir uma segunda população de células antes da referida cultura no referido terceiro meio; e a referida segunda população de células é cultivada no referido terceiro meio durante 15-25 dias, isto é, as células são cultivadas em um total de 26-42 dias.

[0168] Em uma modalidade específica, nos métodos de três estágios descritos neste documento, as referidas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são cultivadas no referido primeiro meio por cerca de 10 dias para produzir uma primeira população de células, antes da referida cultura no referido segundo meio; a referida primeira população de células é cultivada no referido segundo meio por cerca de 4 dias para produzir uma segunda população de célula antes da referida cultura no referido meio; e a referida segunda população de células é cultivada no referido terceiro meio por cerca de 21 dias, isto é, as células são cultivadas em um total de cerca de 35 dias.

[0169] Em certos aspectos, o método de três estágios divulgado neste documento produz pelo menos 5.000 vezes mais células exterminadoras naturais em comparação com o número de células-tronco hematopoiéticas inicialmente inoculadas no referido primeiro meio. Em certos aspectos, o referido método de três estágios produz pelo menos 10.000 vezes mais células exterminadoras naturais em comparação com o número de células-tronco hematopoiéticas inicialmente inoculadas no referido primeiro meio. Em certos aspectos, o referido método de três estágios produz pelo menos 50.000 vezes mais células exterminadoras naturais em comparação com o número de células-tronco hematopoiéticas inicialmente inoculadas no referido primeiro meio. Em certos aspectos, o referido método de três estágios produz pelo menos 75.000 vezes mais células exterminadoras naturais em comparação com o número de células-tronco hematopoiéticas inicialmente inoculadas no referido primeiro meio. Em certos aspectos, a viabilidade das referidas células exterminadoras naturais é determinada por coloração com 7-aminoactinomicina D (7AAD). Em certos aspectos, a viabilidade das referidas células exterminadoras naturais é determinada por coloração com anexina-V. Em aspectos específicos, a viabilidade das referidas células exterminadoras naturais é determinada por coloração com 7-AAD e coloração com anexina-V. Em certos aspectos, a viabilidade das referidas células exterminadoras naturais é determinada por coloração com azul de tripano.

[0170] Em certos aspectos, o método de três estágios divulgado neste documento produz pelo menos 5.000 vezes mais células ILC3 em comparação com o número de células-tronco hematopoiéticas inicialmente inoculadas no referido primeiro meio. Em certos aspectos, o referido método de três estágios produz pelo menos 10.000 vezes mais células ILC3 em comparação com o número de células-tronco hematopoiéticas inicialmente inoculadas no referido

primeiro meio. Em certos aspectos, o referido método de três estágios produz pelo menos 50.000 vezes mais células ILC3 em comparação com o número de células-tronco hematopoiéticas inicialmente inoculadas no referido primeiro meio. Em certos aspectos, o referido método de três estágios produz pelo menos 75.000 vezes mais células ILC3 em comparação com o número de células-tronco hematopoiéticas inicialmente inoculadas no referido primeiro meio.

[0171] Em certos aspectos, o método de três estágios produz células exterminadoras naturais que compreendem pelo menos 20% de células exterminadoras naturais CD56 + CD3–. Em certos aspectos, o método de três estágios produz células exterminadoras naturais que compreendem pelo menos 40% de células exterminadoras naturais CD56 + CD3–. Em certos aspectos, o método de três estágios produz células exterminadoras naturais que compreendem pelo menos 60% de células exterminadoras naturais CD56 + CD3–. Em certos aspectos, o método de três estágios produz células exterminadoras naturais que compreendem pelo menos 70% de células exterminadoras naturais CD56 + CD3–. Em certos aspectos, o método de três estágios produz células exterminadoras naturais que compreendem pelo menos 80% de células exterminadoras naturais CD56 + CD3–.

[0172] Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células exterminadoras naturais que compreendem pelo menos 20% de células exterminadoras naturais CD56+CD3–CD11a+. Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células exterminadoras naturais que compreendem pelo menos 40% de células exterminadoras naturais CD56+CD3–CD11a+. Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células exterminadoras naturais que compreendem pelo menos 60% de células exterminadoras naturais CD56+CD3–CD11a+. Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células

exterminadoras naturais que compreendem pelo menos 80% de células exterminadoras naturais CD56+CD3–CD11a+.

[0173] Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células ILC3 que compreendem pelo menos 20% de células ILC3 CD56+CD3–CD11a-. Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células ILC3 que compreendem pelo menos 40% de células ILC3 CD56+CD3–CD11a-. Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células ILC3 que compreendem pelo menos 60% de células ILC3 CD56+CD3–CD11a-. Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células exterminadoras naturais que compreendem pelo menos 80% de células ILC3 CD56+CD3–CD11a-.

[0174] Em certos aspectos, o método de três estágios produz células exterminadoras naturais que exibem pelo menos 20% de citotoxicidade contra as células K562 quando as referidas células exterminadoras naturais e as referidas células K562 são co-cultivadas *in vitro* ou *ex vivo* em uma razão de 10:1. Em certos aspectos, o método de três estágios produz células exterminadoras naturais que exibem pelo menos 35% de citotoxicidade contra as células K562 quando as referidas células exterminadoras naturais e as referidas células K562 são co-cultivadas *in vitro* ou *ex vivo* em uma razão de 10:1. Em certos aspectos, o método de três estágios aqui divulgado produz células exterminadoras naturais que exibem pelo menos 45% de citotoxicidade contra células K562 quando as referidas células exterminadoras naturais e as referidas células K562 são co-cultivadas *in vitro* ou *ex vivo* a uma razão de 10:1. Em certos aspectos, o método de três estágios produz células exterminadoras naturais que exibem pelo menos 60% de citotoxicidade contra as células K562 quando as referidas células exterminadoras naturais e as referidas células K562 são co-cultivadas *in vitro* ou *ex vivo* em uma razão de 10:1. Em certos aspectos, o método de três

estágios aqui divulgado produz células exterminadoras naturais que exibem pelo menos 75% de citotoxicidade contra células K562 quando as referidas células exterminadoras naturais e as referidas células K562 são co-cultivadas *in vitro* ou *ex vivo* a uma razão de 10:1.

[0175] Em certos aspectos, o método de três estágios produz células ILC3 que exibem pelo menos 20% de citotoxicidade contra as células K562 quando as referidas células ILC3 e as referidas células K562 são co-cultivadas *in vitro* ou *ex vivo* em uma razão de 10:1. Em certos aspectos, o método de três estágios produz células ILC3 que exibem pelo menos 35% de citotoxicidade contra as células K562 quando as referidas células ILC3 e as referidas células K562 são co-cultivadas *in vitro* ou *ex vivo* em uma razão de 10:1. Em certos aspectos, o método de três estágios produz células ILC3 que exibem pelo menos 45% de citotoxicidade contra células K562 quando as referidas células ILC3 e as referidas células K562 são co-cultivadas *in vitro* ou *ex vivo* a uma razão de 10:1. Em certos aspectos, o método de três estágios produz células ILC3 que exibem pelo menos 60% de citotoxicidade contra as células K562 quando as referidas células ILC3 e as referidas células K562 são co-cultivadas *in vitro* ou *ex vivo* em uma razão de 10:1. Em certos aspectos, o método de três estágios produz células ILC3 que exibem pelo menos 75% de citotoxicidade contra células K562 quando as referidas células ILC3 e as referidas células K562 são co-cultivadas *in vitro* ou *ex vivo* a uma razão de 10:1.

[0176] Em certos aspectos, após a referida terceira etapa de cultura, a referida terceira população de células, *por exemplo*, a referida população de células exterminadoras naturais e/ou células ILC3, é criopreservada. Em certos aspectos, após a referida quarta etapa, a referida quarta população de células, *por exemplo*, a referida população de células exterminadoras naturais e /ou células ILC3, é criopreservada.

[0177] Em certos aspectos, são fornecidas aqui populações de células compreendendo células exterminadoras naturais, *ou seja*, células exterminadoras naturais produzidas por um método de três estágios aqui descrito. Por conseguinte, é fornecida aqui uma população de células exterminadoras naturais isolada produzida por um método de três estágios aqui descrito. Em uma modalidade específica, a referida população de células exterminadoras naturais compreende pelo menos 20% de células exterminadoras naturais CD56 + CD3–. Em uma modalidade específica, a referida população de células exterminadoras naturais compreende pelo menos 40% de células exterminadoras naturais CD56 + CD3–. Em uma modalidade específica, a referida população de células exterminadoras naturais compreende pelo menos 60% de células exterminadoras naturais CD56 + CD3–. Em uma modalidade específica, a referida população de células exterminadoras naturais compreende pelo menos 80% de células exterminadoras naturais CD56 + CD3–. Em uma modalidade específica, a referida população de células exterminadoras naturais compreende pelo menos 60% de células CD16-. Em uma modalidade específica, a referida população de células exterminadoras naturais compreende pelo menos 80% de células CD16-. Em uma modalidade específica, a referida população de células exterminadoras naturais compreende pelo menos 20% de células CD94+. Em uma modalidade específica, a referida população de células exterminadoras naturais compreende pelo menos 40% de células CD94+.

[0178] Em certos aspectos, é fornecida aqui uma população de células exterminadoras naturais que é CD56 + CD3– CD117 + CD11a +, em que as referidas células exterminadoras naturais expressam perforina e/ou EOMES e não expressam um ou mais de RORγt, receptor de hidrocarboneto de arila (AHR), e IL1R1. Em certos aspectos, as referidas células exterminadoras naturais expressam perforina e EOMES, e não expressam nenhum de RORγt, receptor de

hidrocarboneto de arila ou IL1R1. Em certos aspectos, as referidas células exterminadoras naturais expressam adicionalmente T-bet, GZMB, NKp46, NKp30 e NKG2D. Em certos aspectos, as referidas células exterminadoras naturais expressam CD94. Em certos aspectos, as referidas células exterminadoras naturais não expressam CD94.

[0179] Em certos aspectos, é fornecida aqui uma população de células ILC3 que é CD56 + CD3– CD117 + CD11a-, em que as referidas células ILC3 expressam um ou mais de RORγt, receptor de hidrocarboneto de arila e IL1R1, e não expressam um ou mais de CD94, perforina e EOMES. Em certos aspectos, as referidas células ILC3 expressam RORγt, receptor de hidrocarboneto de arila e IL1R1, e não expressam nenhum de CD94, perforina ou EOMES. Em certos aspectos, as referidas células ILC3 expressam adicionalmente CD226 e/ou 2B4. Em certos aspectos, as referidas células ILC3 expressam adicionalmente um ou mais de IL-22, TNFα e DNAM-1. Em certos aspectos, as referidas células ILC3 expressam CD226, 2B4, IL-22, TNFα e DNAM-1.

[0180] Em certos aspectos, é fornecido aqui um método de produção de uma população de células compreendendo células exterminadoras naturais e células ILC3, compreendendo (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir um primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem cada um de um agente de mobilização de células-tronco e LMWH, para produzir uma terceira população de células; e (d) separar células CD11a + e células CD11a– da terceira população de células; e (e) combinar as células CD11a

+ com as células CD11a– em uma razão de 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 ou 1:50 para produzir uma quarta população de células. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular. Em certos aspectos, na quarta população de células, as células CD11a + e CD11a– são combinadas em uma razão de 50:1. Em certos aspectos, na quarta população de células, as células CD11a + e CD11a– são combinadas em uma razão de 20:1. Em certos aspectos, na quarta população de células, as células CD11a + e CD11a– são combinadas em uma razão de 10:1. Em certos aspectos, na quarta população de células, as células CD11a + e CD11a– são combinadas em uma razão de 5:1. Em certos aspectos, na quarta população de células, as células CD11a + e CD11a– são combinadas em uma razão de 1:1. Em certos aspectos, na quarta população de células, as células CD11a + e CD11a– são combinadas em uma razão de 1:5. Em certos aspectos, na quarta população de células, as células CD11a + e CD11a– são combinadas em uma razão de 1:10. Em certos aspectos, na quarta população de células, as células CD11a + e CD11a– são combinadas em uma razão de 1:20. Em certos aspectos, na quarta população de células, as células CD11a + e CD11a– são combinadas em uma razão de 1:50.

5.3. Fatores de Mobilização de Células-tronco

5.3.1. Definições de química

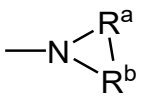
[0181] Para facilitar a compreensão da divulgação dos fatores de

mobilização de célula-tronco aqui estabelecidos, uma série de termos é definida abaixo.

[0182] Em geral, a nomenclatura utilizada neste documento e nos procedimentos de laboratório em biologia, biologia celular, bioquímica, química orgânica, química medicinal e farmacologia aqui descritos são aqueles conhecidos e comumente empregados na técnica. A menos que definidos de outra maneira, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento geralmente têm o mesmo significado que compreendido geralmente por alguém versado na técnica a qual esta divulgação pertence.

[0183] O termo "cerca de" ou "aproximadamente" significa um erro aceitável para um determinado valor conforme determinado pelo versado na técnica, que depende em parte de como o valor é medido ou determinado. Em certas modalidades, o termo "cerca de" ou "aproximadamente" significa dentro de 1, 2, 3 ou 4 desvios padrão. Em certas modalidades, o termo "cerca de" ou "aproximadamente" significa dentro de 50%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% ou 0,05% de um determinado valor ou faixa.

[0184] Tal como aqui utilizado, qualquer grupo "R", tais como, sem limitação, R^a, R^b, R^c, R^d, R^e, R^f, R^g, R^h, R^m, R^G, R^J, R^K, R^U, R^V, R^Y, e R^Z representam substituintes que podem ser ligados ao átomo indicado. Um grupo R pode ser substituído ou não substituído. Se dois grupos "R" são descritos como sendo "tomados em conjunto", os grupos R e os átomos aos quais eles estão ligados podem formar um cicloalquila, cicloalquenila, arila, heteroarila ou heterociclo. Por exemplo, sem limitação, se R^a e R^b de um grupo $NR^a R^b$ são indicados como "tomados em conjunto", isso significa que eles estão covalentemente ligados um ao outro para formar um anel:



[0185] Além disso, se dois grupos "R" são descritos como sendo "tomados em conjunto" com o(s) átomo(s) aos quais estão ligados para formar um anel como alternativa, os grupos R não estão limitados às variáveis ou substituintes definidos anteriormente.

[0186] Sempre que um grupo é descrito como sendo "opcionalmente substituído", esse grupo pode ser não substituído ou substituído por um ou mais dos substituintes indicados. Da mesma forma, quando um grupo é descrito como sendo "não substituído ou substituído" se substituído, o(s) substituinte(s) podem ser selecionados de um ou mais dos substituintes indicados. Se nenhum substituinte for indicado, significa que o grupo "opcionalmente substituído" ou "substituído" indicado pode ser substituído por um ou mais grupo(s) individualmente e independentemente selecionados de alquila, alquenila, alquinila, cicloalquila, cicloalquenila, acilalquila, hidróxi , alcóxi, alcoxialquila, aminoalquila, aminoácido, arila, heteroarila, heterociclila, aril(alquila), heteroaril(alquila), heterociclil(alquila), hidroxialquila, acila, ciano, halogênio, tiocarbonila, O-carbamila, N-carbamila, O-tiocarbamila, N-tiocarbamila, C-amido, N-amido, S-sulfonamido, N-sulfonamido, C-carbóxi, O-carbóxi, isocianato, tiocianato, isotiocianato, azido, nitro, silila, sulfenila, sulfinila, sulfonila, haloalquila, haloalcóxi, tri-halometanossulfonila, tri-halometanossulfonamido, um amino, um grupo amino monossubstituído e um grupo amino dissubstituído.

[0187] Conforme usado neste documento, “C_a a C_b” em que "a" e "b" são números inteiros referem-se ao número de átomos de carbono em um grupo alquila, alquenila ou alquinila, ou o número de átomos de carbono no anel de um grupo cicloalquila, cicloalquenila, arila, heteroarila ou heteroaliciclila. Ou seja, o alquila, alquenila, alquinila, anel(éis) do cicloalquila, anel(éis) do cicloalquenila, anel(éis) do arila, anel(éis) do heteroarila ou anel(éis) do

heteroaliciclila pode conter de “a” a “b”, inclusive, átomos de carbono. Assim, por exemplo, um grupo “C_1 a C_4 alquila” refere-se a todos os grupos alquila tendo de 1 a 4 carbonos, isto é, CH_3-, CH_3CH_2-, $CH_3CH_2CH_2$-, $(CH_3)_2CH$-, $CH_3CH_2CH_2CH_2$-, $CH_3CH_2CH(CH_3)$- e $(CH_3)_3C$-. Se nenhum "a" e "b" forem designados em relação a um grupo alquila, alquenila, alquinila, cicloalquila, cicloalquenila, arila, heteroarila ou heteroaliciclila, a faixa mais ampla descrita nessas definições deve ser presumida.

[0188] Conforme usado neste documento, "alquila" se refere a uma cadeia de hidrocarboneto linear ou ramificada que compreende um grupo de hidrocarboneto totalmente saturado (sem ligações duplas ou triplas). O grupo alquila pode ter 1 a 20 átomos de carbono (sempre que aparece aqui, uma faixa numérica como "1 a 20" refere-se a cada número inteiro no intervalo fornecido; *por exemplo*, "1 a 20 átomos de carbono" significa que o grupo alquila pode consistir em 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, *etc.*, até e incluindo 20 átomos de carbono, embora a presente definição também cubra a ocorrência do termo "alquila" onde nenhuma faixa numérica é designada). O grupo alquila também pode ser um alquila de tamanho médio com 1 a 10 átomos de carbono. O grupo alquila também pode ser um alquila inferior com 1 a 6 átomos de carbono. O grupo alquila dos compostos pode ser designado como “C_1-C_4 alquila” ou designações semelhantes. Apenas a título de exemplo, “C_1-C_4 alquila” indica que existem de um a quatro átomos de carbono na cadeia alquila, ou seja, a cadeia alquila é selecionada do grupo que consiste em metila, etila, propila, isopropila, n- butila, iso-butila, sec-butila e t-butila. Grupos alquila típicos incluem, mas não estão limitados a, metila, etila, propila, isopropila, butila, isobutila, butila terciário, pentila e hexila. O grupo alquila pode ser substituído ou não substituído.

[0189] Conforme usado neste documento, "alquenila" refere-se a um

grupo alquila que contém na cadeia de hidrocarboneto linear ou ramificada uma ou mais ligações duplas. Exemplos de grupos alquenila incluem alenila, vinilmetila e etenila. Um grupo alquenila pode ser não substituído ou substituído.

[0190] Conforme usado neste documento, "alquinila" refere-se a um grupo alquila que contém na cadeia de hidrocarboneto linear ou ramificada uma ou mais ligações triplas. Exemplos de alquinilas incluem etinila e propinila. Um grupo alquinila pode ser não substituído ou substituído.

[0191] Conforme usado neste documento, "cicloalquila" refere-se a um sistema de anel de hidrocarboneto mono- ou multicíclico completamente saturado (sem ligações duplas ou triplas). Quando compostos de dois ou mais anéis, os anéis podem ser unidos de forma fundida. Os grupos cicloalquila podem conter 3 a 10 átomos no(s) anel(éis) ou 3 a 8 átomos no(s) anel(éis). Um grupo cicloalquila pode ser não substituído ou substituído. Os grupos cicloalquila típicos incluem, mas não estão de forma alguma limitados a, ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ciclo-hexila, cicloheptila e ciclo-octila.

[0192] Conforme usado neste documento, "cicloalquenila" refere-se a um sistema de anel de hidrocarboneto mono- ou multicíclico que contém uma ou mais ligações duplas em pelo menos um anel; embora, se houver mais de uma, as ligações duplas não podem formar um sistema de elétrons-pi totalmente deslocalizado em todos os anéis (caso contrário, o grupo seria "arila", conforme definido neste documento). Os grupos cicloalquenila podem conter 3 a 10 átomos no(s) anel(éis) ou 3 a 8 átomos no(s) anel(éis). Quando compostos de dois ou mais anéis, os anéis podem ser conectados de forma fundida. Um grupo cicloalquenila pode ser não substituído ou substituído.

[0193] Como utilizado neste documento, "arila" refere-se a um sistema de anel aromático carbocíclico (todo carbono) monocíclico ou multicíclico

(incluindo sistemas de anéis fundidos onde dois anéis carbocíclicos compartilham uma ligação química) que tem um sistema de elétrons-pi totalmente deslocalizado em todos os anéis. O número de átomos de carbono em um grupo arila pode variar. Por exemplo, o grupo arila pode ser um grupo C_6-C_{14} arila, um grupo C_6-C_{10} arila, ou um grupo C_6 arila. Exemplos de grupos arila incluem, mas não estão limitados a, benzeno, naftaleno e azuleno. Um grupo arila pode ser substituído ou não substituído.

[0194] Como utilizado neste documento, "heteroarila" refere-se a um sistema de anel aromático monocíclico ou multicíclico (um sistema de anel com sistema pi-elétron totalmente deslocalizado) que contém um, dois, três ou mais heteroátomos, ou seja, um elemento diferente de carbono, incluindo, mas não se limitando a, nitrogênio, oxigênio e enxofre. O número de átomos no(s) ane(éis) de um grupo heteroarila pode variar. Por exemplo, o grupo heteroarila pode conter de 4 a 14 átomos no(s) anel(éis), 5 a 10 átomos no(s) anel(éis) ou 5 a 6 átomos no(s) anel(éis). Além disso, o termo "heteroarila" inclui sistemas de anéis fundidos onde dois anéis, como pelo menos um anel arila e pelo menos um anel heteroarila, ou pelo menos dois anéis heteroarila, compartilham pelo menos uma ligação química. Exemplos de anéis heteroarila incluem, mas não estão limitados, aos aqui descritos e os seguintes: furano, furazano, tiofeno, benzotiofeno, ftalazina, pirrol, oxazol, benzoxazol, 1,2,3-oxadiazol, 1,2,4-oxadiazol, tiazol, 1,2,3-tiadiazol, 1,2,4-tiadiazol, benzotiazol, imidazol, benzimidazol, indol, indazol, pirazol, benzopirazol, isoxazol, benzoisoxazol, isotiazol, triazol, benzotriazol, tiadiazol, tetrazol, piridazina, pirimidina, pirazina, purina, pteridina, quinolina, isoquinolina, quinazolina, quinoxalina, cinolina e triazina. Um grupo heteroarila pode ser substituído ou não substituído.

[0195] Como utilizado neste documento, "heterociclila" ou "heteroaliciclila" refere-se a três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, até 18

membros monocíclicos, bicíclicos e sistema de anel tricíclico em que átomos de carbono juntamente com de 1 a 5 heteroátomos constituem o referido sistema de anel. Um heterociclo pode conter opcionalmente uma ou mais ligações insaturadas situadas de tal forma, no entanto, que um sistema pi-elétron totalmente deslocalizado não ocorre em todos os anéis. O(s) heteroátomo(s) é(são) um elemento diferente de carbono incluindo, mas não se limitando a, oxigênio, enxofre e nitrogênio. Um heterociclo pode conter ainda uma ou mais funcionalidades carbonila ou tiocarbonila, de modo a fazer com que a definição inclua oxo-sistemas e tio-sistemas, tais como lactamas, lactonas, imidas cíclicas, tioimidas cíclicas e carbamatos cíclicos. Quando compostos de dois ou mais anéis, os anéis podem ser unidos de forma fundida. Além disso, quaisquer nitrogênios em um heterociclila podem ser quaternizados. Os grupos heterociclila ou heteroalicíclicos podem ser não substituídos ou substituídos. Exemplos de tais grupos "heterociclila" ou "heteroaliciclila" incluem, mas não estão limitados a, aqueles aqui descritos e os seguintes: 1,3-dioxina, 1,3-dioxano, 1,4-dioxano, 1,2-dioxolano, 1,3-dioxolano, 1,4-dioxolano, 1,3-oxatiano, 1,4-oxati-ina, 1,3-oxatiolano, 1,3-ditiol, 1,3-ditiolano, 1,4-oxatiano, tetra-hidro- 1,4-tiazina, 1,3-tiazinano, 2H-1,2-oxazina, maleimida, succinimida, ácido barbitúrico, ácido tiobarbitúrico, dioxopiperazina, hidantoína, di-hidrouracil, trioxano, hexa-hidro-1,3,5-triazina, imidazolina, imidazolidina, isoxazolina, isoxazolidina, oxazolina, oxazolidina, oxazolidinona, tiazolina, tiazolidina, morfolina, oxirano, piperidina *N*-Óxido, piperidina, piperazina, pirrolidina, pirrolidona, pirrolidiona, 4-piperidona, pirazolina, pirazolidina, 2-oxopirrolidina, tetra-hidropirano, 4H-pirano, tetra-hidrotiopirano, tiamorfolina, tiamorfolina, sulfóxido de tiamorfolina, sulfóxido de tiamorfolina, e seus análogos fundidos com benzo (por exemplo, benzimidazolidinona, tetra-hidroquinolina e 3,4-metilenodioxifenila).

[0196] Conforme usado neste documento, "aralquila" e "aril(alquila)"

referem-se a um grupo arila conectado, como um substituinte, por meio de um grupo alquileno inferior. O alquileno inferior e o grupo arila de um aralquila podem ser substituídos ou não substituídos. Os exemplos incluem, mas não estão limitados a benzila, 2-fenilalquila, 3-fenilalquila e naftilalquila.

[0197] Conforme usado neste documento, "heteroaralquila" e "heteroaril (alquila)" referem-se a um grupo heteroarila conectado, como um substituinte, por meio de um grupo alquileno inferior. O grupo alquileno inferior e o heteroarila do heteroaralquila podem ser substituídos ou não substituídos. Os exemplos incluem, mas não estão limitados a 2-tienilalquila, 3-tienilalquila, furilalquila, tienilalquila, pirrolilalquila, piridilalquila, isoxazolilalquila, imidazolilalquila e seus análogos fundidos com benzo.

[0198] Um "heteroaliciclil(alquila)" e "heterociclil(alquila)" refere-se a um grupo heterocíclico ou heteroalicíclico conectado, como um substituinte, por meio de um grupo alquileno inferior. O alquileno inferior e o heterociclila de um heteroaliciclil(alquila) podem ser substituídos ou não substituídos. Exemplos incluem, mas não estão limitados a tetra-hidro-2H-piran-4-il(metila), piperidin-4-il(etil), piperidin-4-il(propila), tetra-hidro-2H-tiopiran-4-il(metila), e 1,3-tiazinan-4-il(metila).

[0199] "Grupos alquileno inferior" são grupos de ligação -CH_2- de cadeia linear, formando ligações para conectar fragmentos moleculares por meio de seus átomos de carbono terminais. Os exemplos incluem, mas não estão limitados ametileno (-CH_2-), etileno (-CH_2CH_2-), propileno (-$CH_2CH_2CH_2$-), e butileno (-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-). Um grupo alquileno inferior pode ser substituído pela substituição de um ou mais hidrogênio do grupo alquileno inferior por um substituinte(s) listado(s) na definição de "substituído".

[0200] Como utilizado neste documento, "alcóxi" refere-se à fórmula –OR em que R é um alquila, um alquenila, um alquinila, um cicloalquila, um

cicloalquenila, arila, heteroarila, heterociclila, cicloalquil (alquila), aril (alquila), heteroaril (alquila) ou heterociclil (alquila) é definido aqui. Uma lista não limitativa de alcóxi são metóxi, etóxi, n-propóxi, 1-metiletóxi (isopropóxi), n-butóxi, iso-butóxi, sec-butóxi, terc-butóxi, fenóxi e benzóxi. Um alcóxi pode ser substituído ou não substituído.

[0201] Como utilizado neste documento, "acila" refere-se a um hidrogênio, um alquila, um alquenila, um alquinila, um cicloalquila, um cicloalquenila, arila, heteroarila, heterociclila, cicloalquil(alquila), aril(alquila), heteroaril(alquila) ou heterociclil(alquila) conectado, como substituintes, por meio de um grupo carbonila. Exemplos incluem formila, acetila, propanoila, benzoila e acrila. Um acila pode ser substituído ou não substituído.

[0202] Conforme utilizado neste documento, "acilalquila" refere-se a um acila conectado, como um substituinte, por meio de um grupo alquileno inferior. Os exemplos incluem ari-C(=O)-$(CH_2)_n$- e heteroaril-C(=O)-$(CH_2)_n$-, onde n é um número inteiro na faixa de 1 a 6.

[0203] Conforme usado neste documento, "alcoxialquila" refere-se a um grupo alcóxi conectado, como um substituinte, por meio de um grupo alquileno inferior. Os exemplos incluem C_{1-4} alquil-O-$(CH_2)_n$-, em que n é um número inteiro na faixa de 1 a 6.

[0204] Conforme utilizado neste documento, "aminoalquila" refere-se a um grupo amino opcionalmente substituído conectado, como um substituinte, por meio de um grupo alquileno inferior. Os exemplos incluem $H_2N(CH_2)_n$-, em que n é um número inteiro na faixa de 1 a 6.

[0205] Conforme usado neste documento, "hidroxialquila" refere-se a um grupo alquila no qual um ou mais dos átomos de hidrogênio são substituídos por um grupo hidróxi. Grupos hidroxialquila exemplificativos incluem, mas não estão limitados a, 2-hidroxietila, 3-hidroxipropila, 2-hidroxipropila e 2,2-di-hidroxietila.

Um hidroxialquila pode ser substituído ou não substituído.

[0206] Como utilizado neste documento, "haloalquila" refere-se a um grupo alquila no qual um ou mais dos átomos de hidrogênio são substituídos por um halogênio (por exemplo, mono-haloalquila, di-haloalquila e tri-haloalquila). Esses grupos incluem, mas não estão limitados a, clorometila, fluorometila, difluorometila, trifluorometila, cloro-fluoroalquila, cloro-difluoroalquila e 2-fluoroisobutila. Um haloalquila pode ser substituído ou não substituído.

[0207] Conforme utilizado neste documento, "haloalcóxi" refere-se a um grupo alcóxi em que um ou mais dos átomos de hidrogênio são substituídos por um halogênio (por exemplo, mono-haloalcóxi, di-haloalcóxi e tri-haloalcóxi). Esses grupos incluem, mas não estão limitados a, clorometóxi, fluorometóxi, difluorometóxi, trifluorometóxi, cloro-fluoroalquila, cloro-difluoroalcóxi e 2-fluoroisobutóxi. Um haloalcóxi pode ser substituído ou não substituído.

[0208] Um grupo "sulfenila" refere-se a um grupo "-SR" em que R pode ser hidrogênio, um alquila, um alquenila, um alquinila, um cicloalquila, um cicloalquenila, arila, heteroarila, heterociclila, cicloalquil (alquila), aril (alquila), heteroaril (alquila) ou heterociclil (alquila). Um sulfenila pode ser substituído ou não substituído.

[0209] Um grupo "sulfinila" refere-se a um grupo "-S(=O)-R" em que R pode ser o mesmo definido em relação ao sulfenila. Um sulfinila pode ser substituído ou não substituído.

[0210] Um grupo "sulfonila" refere-se a um grupo “SO_2R” em que R pode ser o mesmo definido em relação ao sulfenila. Um sulfonila pode ser substituído ou não substituído.

[0211] Um grupo "O-carbóxi" refere-se a um grupo "RC(=O)O-" em que R pode ser hidrogênio, um alquila, um alquenila, um alquinila, um cicloalquila, um cicloalquenila, arila, heteroarila, heterociclila, cicloalquil (alquila), aril (alquila),

heteroaril (alquila) ou heterociclil (alquila), como aqui definido. Um O-carbóxi pode ser substituído ou não substituído.

[0212] Os termos "éster" e "C-carbóxi" referem-se a um grupo "-C(=O)OR" em que R pode ser o mesmo definido em relação a O-carbóxi. Um éster e C-carbóxi podem ser substituídos ou não substituídos.

[0213] Um grupo "tiocarbonila" refere-se a um grupo "-C(=S)R" em que R pode ser o mesmo definido em relação a O-carbóxi. Um tiocarbonila pode ser substituído ou não substituído.

[0214] Um grupo "tri-halometanossulfonila" refere-se a um grupo “X_3CSO_2-” em que cada X é um halogênio.

[0215] Um grupo "tri-halometanossulfonamido" refere-se a um grupo “$X_3CS(O)_2N(R_A)$-” em que cada X é um halogênio, e R_A hidrogênio, um alquila, um alquenila, um alquinila, um cicloalquila, um cicloalquenila, arila, heteroarila, heterociclila, cicloalquil (alquila), aril (alquila), heteroaril (alquila) ou heterociclil (alquila).

[0216] O termo "amino", conforme usado neste documento, refere-se a um grupo $–NH_2$.

[0217] Conforme usado neste documento, o termo "hidróxi" se refere a um grupo –OH.

[0218] Um grupo "ciano" refere-se a um grupo "-CN".

[0219] O termo "azido", conforme usado neste documento, refere-se a um grupo $–N_3$.

[0220] Um grupo "isocianato" refere-se a um grupo "-NCO".

[0221] Um grupo "tiocianato" refere-se a um grupo "-CNS".

[0222] Um grupo "isotiocianato" refere-se a um grupo "-NCS".

[0223] Um grupo "carbonila" refere-se a um grupo C = O.

[0224] Um grupo "S-sulfonamido" refere-se a um grupo “$-SO_2N(R_AR_B)$” no

qual R_A e R_B podem ser independentemente hidrogênio, um alquila, um alquenila, um alquinila, um cicloalquila, um cicloalquenila, arila, heteroarila, heterociclila, cicloalquil (alquila), aril (alquila), heteroaril (alquila) ou heterociclil (alquila). Um S-sulfonamido pode ser substituído ou não substituído.

[0225] Um grupo "N-sulfonamido" refere-se a um grupo “$RSO_2N(R_A)$-” no qual R e R_A podem ser independentemente hidrogênio, um alquila, um alquenila, um alquinila, um cicloalquila, um cicloalquenila, arila, heteroarila, heterociclila, cicloalquil (alquila), aril (alquila), heteroaril (alquila) ou heterociclil (alquila). Um N-sulfonamido pode ser substituído ou não substituído.

[0226] Um grupo "O-carbamila" refere-se a um grupo “$-OC(=O)N(R_AR_B)$” no qual R_A e R_B podem ser independentemente hidrogênio, um alquila, um alquenila, um alquinila, um cicloalquila, um cicloalquenila, arila, heteroarila, heterociclila, cicloalquil (alquila), aril (alquila), heteroaril (alquila) ou heterociclil (alquila). Um O-carbamila pode ser substituído ou não substituído.

[0227] Um grupo "N-carbamil" refere-se a um grupo “$ROC(=O)N(R_A)$-” no qual R e R_A podem ser independentemente hidrogênio, um alquila, um alquenila, um alquinila, um cicloalquila, um cicloalquenila, arila, heteroarila, heterociclila, cicloalquil (alquila), aril (alquila), heteroaril (alquila) ou heterociclil (alquila). Um N-carbamila pode ser substituído ou não substituído.

[0228] Um grupo "O-tiocarbamila" refere-se a um grupo “$-OC(=S)-N(R_AR_B)$” no qual R_A e R_B podem ser independentemente hidrogênio, um alquila, um alquenila, um alquinila, um cicloalquila, um cicloalquenila, arila, heteroarila, heterociclila, cicloalquil (alquila), aril (alquila), heteroaril (alquila) ou heterociclil (alquila). Um O-tiocarbamila pode ser substituído ou não substituído.

[0229] Um grupo "N-tiocarbamila" refere-se a um grupo “$ROC(=S)N(R_A)$-” no qual R e R_A podem ser independentemente hidrogênio, um alquila, um alquenila, um alquinila, um cicloalquila, um cicloalquenila, arila, heteroarila,

heterociclila, cicloalquil (alquila), aril (alquila), heteroaril (alquila) ou heterociclil (alquila). Um N-tiocarbamila pode ser substituído ou não substituído.

[0230] Um grupo "C-amido" refere-se a um grupo “-C(=O)N(R_AR_B)” no qual R_A e R_B podem ser independentemente hidrogênio, um alquila, um alquenila, um alquinila, um cicloalquila, um cicloalquenila, arila, heteroarila, heterociclila, cicloalquil (alquila), aril (alquila), heteroaril (alquila) ou heterociclil (alquila). Um C-amido pode ser substituído ou não substituído.

[0231] Um grupo "N-amido" refere-se a um grupo “RC(=O)N(R_A)-” no qual R e R_A podem ser independentemente hidrogênio, um alquila, um alquenila, um alquinila, um cicloalquila, um cicloalquenila, arila, heteroarila, heterociclila, cicloalquil (alquila), aril (alquila), heteroaril (alquila) ou heterociclil (alquila). Um N-amido pode ser substituído ou não substituído.

[0232] Um grupo "ureia" refere-se ao grupo “N(R)-C(=O)-NR_AR_B no qual R pode ser hidrogênio ou um alquila, e R_A e R_B podem ser independentemente hidrogênio, um alquila, um alquenila, um alquinila, um cicloalquila, um cicloalquenila, arila, heteroarila, heterociclila, cicloalquil (alquila), aril (alquila), heteroaril (alquila) ou heterociclil (alquila). Uma ureia pode ser substituída ou não substituída.

[0233] O termo "átomo de halogênio" ou "halogênio", como utilizado neste documento, significa qualquer um dos átomos radioestáveis da coluna 7 da Tabela Periódica dos Elementos, como flúor, cloro, bromo e iodo.

[0234] Conforme usado neste documento, "--------" indica uma ligação simples ou dupla, a menos que indicado de outra forma.

[0235] Onde o número de substituintes não é especificado (por exemplo, haloalquila), pode haver um ou mais substituintes presentes. Por exemplo, "haloalquila" pode incluir um ou mais halogênios iguais ou diferentes. Como outro exemplo, “C_1-C_3 alcoxifenila” pode incluir um ou mais grupos alcóxi iguais

ou diferentes contendo um, dois ou três átomos.

[0236] Conforme usado neste documento, as abreviaturas para quaisquer grupos de proteção, aminoácidos e outros compostos são, salvo indicação em contrário, de acordo com seu uso comum, abreviações reconhecidas ou a Comissão IUPAC-IUB sobre Nomenclatura Bioquímica (Ver, Biochem. 11:942-944 (1972)).

[0237] Em certas modalidades, "opticamente ativo" e "enantiomericamente ativo" referem-se a uma coleção de moléculas, que tem um excesso enantiomérico não inferior a cerca de 50%, não inferior a cerca de 70%, não inferior a cerca de 80%, não inferior a cerca de 90%, não menos que cerca de 91%, não menos que cerca de 92%, não menos que cerca de 93%, não menos que cerca de 94%, não menos que cerca de 95%, não menos que cerca de 96%, não menos que cerca de 97%, não menos do que cerca de 98%, não menos do que cerca de 99%, não menos do que cerca de 99,5%, ou não menos do que cerca de 99,8%. Em certas modalidades, o composto compreende cerca de 95% ou mais do enantiômero desejado e cerca de 5% ou menos do enantiômero menos preferido com base no peso total dos dois enantiômeros em questão.

[0238] Na descrição de um composto opticamente ativo, os prefixos R e S são usados para denotar a configuração absoluta do composto opticamente ativo sobre seus centros quirais. O (+) e (-) são usados para denotar a rotação óptica de um composto opticamente ativo, ou seja, a direção em que um plano de luz polarizada é girado pelo composto opticamente ativo. O prefixo (-) indica que um composto opticamente ativo é levógiro, isto é, o composto gira o plano da luz polarizada para a esquerda ou para a esquerda. O prefixo (+) indica que o composto opticamente ativo é dextrógiro, ou seja, o composto gira o plano da luz polarizada para a direita ou no sentido horário. No entanto, o sinal de rotação

ótica, (+) e (-), não está relacionado com a configuração absoluta de um composto, R e S.

[0239] O termo "variante isotópica" refere-se a um composto que contém uma proporção antinatural de um isótopo em um ou mais dos átomos que constituem um tal composto. Em certas modalidades, uma "variante isotópica" de um composto contém proporções não naturais de um ou mais isótopos, incluindo, mas não se limitando a, hidrogênio (^{1}H), deutério (^{2}H), trítio (^{3}H), carbono-11 (^{11}C), carbono-12 (^{12}C), carbono-13 (^{13}C), carbono-14 (^{14}C), nitrogênio-13 (^{13}N), nitrogênio-14 (^{14}N), nitrogênio-15 (^{15}N), oxigênio-14 (^{14}O), oxigênio-15 (^{15}O), oxigênio-16 (^{16}O), oxigênio-17 (^{17}O), oxigênio-18 (^{18}O), flúor-17 (^{17}F), flúor-18 (^{18}F), fósforo-31 (^{31}P), fósforo-32 (^{32}P), fósforo-33 (^{33}P), enxofre-32 (^{32}S), enxofre-33 (^{33}S), enxofre-34 (^{34}S), enxofre-35 (^{35}S), enxofre-36 (^{36}S), cloro-35 (^{35}Cl), cloro-36 (^{36}Cl), cloro-37 (^{37}Cl), bromo-79 (^{79}Br), bromo-81 (^{81}Br), iodo-123 (^{123}I), iodo-125 (^{125}I), iodo-127 (^{127}I), iodo-129 (^{129}I), e iodo-131 (^{131}I). Em determinadas modalidades, uma "variante isotópica" de um composto está em uma forma estável, ou seja, não radioativa. Em certas modalidades, uma "variante isotópica" de um composto contém proporções não naturais de um ou mais isótopos, incluindo, mas não se limitando a, hidrogênio (^{1}H), deutério (^{2}H), carbono-12 (^{12}C), carbono-13 (^{13}C), nitrogênio-14 (^{14}N), nitrogênio-15 (^{15}N), oxigênio-16 (^{16}O), oxigênio-17 (^{17}O), oxigênio-18 (^{18}O), flúor-17 (^{17}F), fósforo-31 (^{31}P), enxofre-32 (^{32}S), enxofre-33 (^{33}S), enxofre-34 (^{34}S), enxofre-36 (^{36}S), cloro-35 (^{35}Cl), cloro-37 (^{37}Cl), bromo-79 (^{79}Br), bromo-81 (^{81}Br), e iodo-127 (^{127}I). Em determinadas modalidades, uma "variante isotópica" de um composto está em uma forma não estável, ou seja, radioativa. Em certas modalidades, uma "variante isotópica" de um composto contém proporções não naturais de um ou mais isótopos, incluindo, mas não se limitando a, trítio (^{3}H), carbono-11 (^{11}C), carbono-14 (^{14}C), nitrogênio-13 (^{13}N), oxigênio-14 (^{14}O), oxigênio-15 (^{15}O), flúor-

18 (^{18}F), fósforo-32 (^{32}P), fósforo-33 (^{33}P), enxofre-35 (^{35}S), cloro-36 (^{36}Cl), iodo-123 (^{123}I), iodo-125 (^{125}I), iodo-129 (^{129}I), e iodo-131 (^{131}I). Será entendido que, em um composto como fornecido neste documento, qualquer hidrogênio pode ser ^{2}H, por exemplo, ou qualquer carbono pode ser ^{13}C, por exemplo, ou qualquer nitrogênio pode ser ^{15}N, por exemplo, ou qualquer oxigênio pode ser ^{18}O, por exemplo, quando viável de acordo com o julgamento de um versado. Em determinadas modalidades, uma "variante isotópica" de um composto contém proporções não naturais de deutério (D).

[0240] O termo "solvato" refere-se a um complexo ou agregado formado por uma ou mais moléculas de um soluto, *por exemplo*, um composto aqui fornecido e uma ou mais moléculas de um solvente, que se apresentam em uma quantidade estequiométrica ou não estequiométrica. Os solventes adequados incluem, mas não estão limitados a, água, metanol, etanol *n*-propanol, isopropanol e ácido acético. Em certas modalidades, o solvente é farmaceuticamente aceitável. Em uma modalidade, o complexo ou agregado está em uma forma cristalina. Em outra modalidade, o complexo ou agregado está em uma forma não cristalina. Onde o solvente é água, o solvato é um hidrato. Exemplos de hidratos incluem, mas não estão limitados a, um hemi-hidrato, mono-hidrato, di-hidrato, tri-hidrato, tetra-hidrato e penta-hidrato.

[0241] A frase "um enantiômero, uma mistura de enantiômeros, uma mistura de dois ou mais diastereômeros ou uma variante isotópica dos mesmos; ou um sal, solvato, hidrato ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável do mesmo" tem o mesmo significado que a frase "(i) um enantiômero, uma mistura de enantiômeros, uma mistura de dois ou mais diastereômeros ou uma variante isotópica do composto aqui referenciado; (ii) um sal, solvato, hidrato ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável do composto aqui referenciado; ou (iii) um sal, solvato, hidrato ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável de um

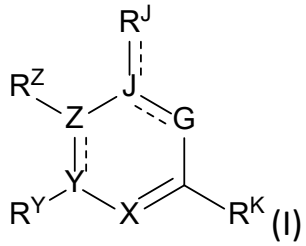
enantiômero, uma mistura de enantiômeros, uma mistura de dois ou mais diastereômeros ou uma variante isotópica do composto aqui referenciado."

5.3.2. Compostos de Mobilização de Células-tronco

[0242] Em certos aspectos, o fator de mobilização de células-tronco é um composto com a Fórmula (I), (I-A), (I-B), (I-C) ou (I-D), conforme descrito abaixo.

Fórmula (I)

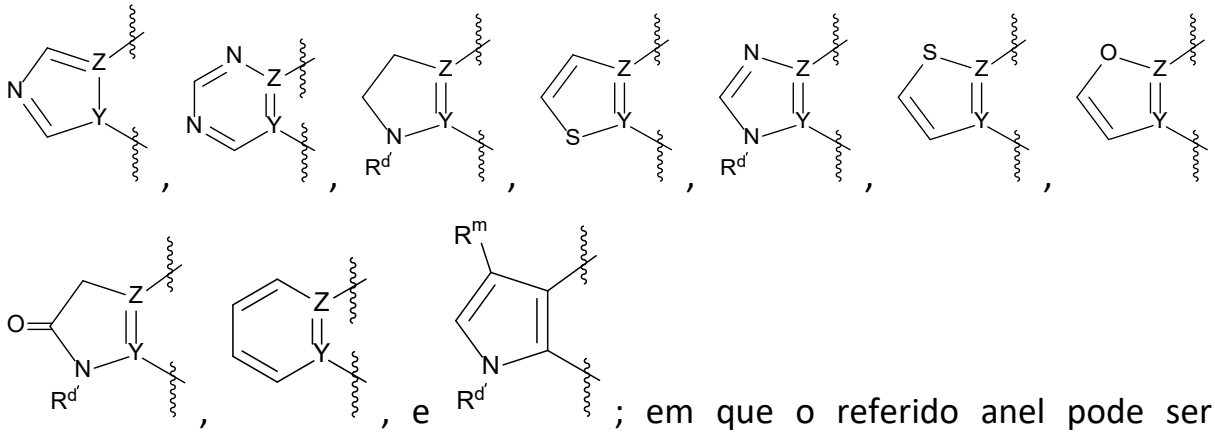
[0243] Algumas modalidades aqui divulgadas se referem a um composto de Fórmula (I), ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, tendo a estrutura:



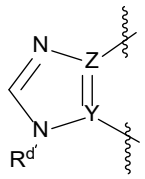
(I)

em que: cada ------ pode representar independentemente uma ligação simples ou dupla; $\mathbf{R^J}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em –N$\mathbf{R^aR^b}$, -O$\mathbf{R^b}$, e = O; em que se $\mathbf{R^J}$ é = O, então ------ juntar **G** e**J** representa uma ligação simples e **G** é N e o N é substituído com $\mathbf{R^G}$; caso contrário, juntar ------ **G** e **J** representa uma ligação dupla e **G** é N; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio ou C_1-C_4 alquila; $\mathbf{R^b}$ pode ser $\mathbf{R^c}$ ou -(C_1-C_4 alquil)-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, -O(C_1-C_4 alquila), -O(C_1-C_4 haloalquila); -C(=O)NH_2; C_{6-10} arila não substituído; C_{6-10} arila substituído; heteroarila não substituído de cinco a dez membros possuindo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído por 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^c}$ indicada como substituída pode ser substituída por um ou mais substituintes **E**, em que cada **E** pode ser independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila); $\mathbf{R^K}$

pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: hidrogênio, C_{1-6} alquila não substituído; C_{1-6} alquila substituído; -NH(C_{1-4} alquila); -N(C_{1-4} alquila)$_2$, C_{6-10} arila não substituído; C_{6-10} arila substituído; heteroarila não substituído de cinco a dez membros possuindo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído por 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção **R^K** indicada como substituída pode ser substituída por um ou mais substituintes **Q**, em que cada **Q** é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila), e -O-(C_{1-4} haloalquila); **R^G** pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, C_{1-4} alquila, e -(C_{1-4} alquil)-C(=O)NH_2; **R^Y** e **R^Z** podem, cada um, independentemente estar ausentes ou ser selecionados a partir do grupo que consiste em: hidrogênio, halo, C_{1-6} alquila, -OH, -O-(C_{1-4} alquila), -NH(C_{1-4} alquila), e -N(C_{1-4} alquila)$_2$; ou **R^Y** e **R^Z** tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser unidos para formar um anel selecionado a partir de:



; em que o referido anel pode ser opcionalmente substituído por um, dois ou três grupos independentemente selecionados a partir de C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -OH, -O-(C_{1-4} alquila), -N(C_{1-4} alquila)$_2$, C_6-C_{10} arila não substituído, C_6-C_{10} arila substituído por 1-5 átomos de halo, e -O-(C_{1-4} haloalquila); e em que se **R^Y** e **R^Z** considerados

juntos formarem , então $\mathbf{R^J}$ pode ser -O$\mathbf{R^b}$ ou =O; $\mathbf{R^d}$ pode ser hidrogênio ou C_1-C_4 alquila; $\mathbf{R^m}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em C_{1-4} alquila, halo, e ciano; **J** pode ser C; e **X**, **Y**, e **Z** cada um pode ser independentemente N ou C, em que a valência de qualquer átomo de carbono é preenchida conforme necessário com átomos de hidrogênio.

[0244] Em algumas modalidades, ------ pode representar uma ligação simples. Em outras modalidades, ------ pode representar uma ligação dupla. Em algumas modalidades, ------ a união de **Y** e **Z** pode representar uma única ligação. Em outras modalidades, ------ a união de **Y** e **Z** pode representar uma ligação dupla. Em algumas modalidades, ao ------ unir **G** e **J** representa uma ligação simples, **G** pode ser N e o N é substituído por $\mathbf{R^G}$. Em outras modalidades, ao ------ unir **G** e **J** representa uma ligação dupla, **G** pode ser N. Em algumas modalidades, ao ------ unir **G** e **J** representa uma ligação dupla, então ------ unir **J** e $\mathbf{R^J}$ pode ser uma ligação simples. Em algumas modalidades, ao ------ unir **G** e **J** representa uma ligação dupla, então, ------ unir **J** e $\mathbf{R^J}$ não pode ser uma ligação dupla. Em algumas modalidades, ao ------ unir **J** e $\mathbf{R^J}$ representa uma ligação dupla, então ------ unir **G** e **J** pode ser uma ligação simples. Em algumas modalidades, ao ------ unir **J** e $\mathbf{R^J}$ representa uma ligação dupla, então ------ unir **G** e **J** não pode ser uma ligação dupla.

[0245] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^J}$ pode ser –N$\mathbf{R^a R^b}$. Em outras modalidades, $\mathbf{R^J}$ pode ser -O$\mathbf{R^b}$. Em ainda outras modalidades, $\mathbf{R^J}$ pode ser = O. Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é =O, então ------ unir **G** e **J** representa uma ligação simples **G** é N e o N é substituído por $\mathbf{R^G}$. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^G}$ é -CH_2CH_2-C(=O)NH_2.

[0246] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio. Em algumas

modalidades, $\mathbf{R^a}$ pode ser C_1-C_4 alquila. Por exemplo, $\mathbf{R^a}$ pode ser metila, etila, n-propila, iso-propila, n-butila, iso-butila ou terc-butila.

[0247] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^b}$ pode ser $\mathbf{R^c}$. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^b}$ pode ser -(C_1-C_4 alquil)-$\mathbf{R^c}$. Por exemplo, $\mathbf{R^b}$ pode ser -CH_2-$\mathbf{R^c}$, -CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$, -$CH_2CH_2CH_2$-$\mathbf{R^c}$, ou -$CH_2CH_2CH_2CH_2$-$\mathbf{R^c}$. Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^b}$ é -CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$, $\mathbf{R^c}$ pode ser -O(C_1-C_4 alquila). Em outras modalidades, quando $\mathbf{R^b}$ é -CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$, $\mathbf{R^c}$ pode ser -O(C_1-C_4 haloalquila). Em ainda outras modalidades, quando $\mathbf{R^b}$ é -CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$, $\mathbf{R^c}$ pode ser -C(=O)NH_2.

[0248] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser –OH. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser -O(C_1-C_4 alquila). Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser -O(C_1-C_4 haloalquila). Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser -C(=O)NH_2. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser C_{6-10} arila não substituído. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser C_{6-10} arila substituído. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros substituído tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S. Em algumas modalidades, quando uma fração $\mathbf{R^c}$ é indicada como substituída, a fração pode ser substituída por um ou mais, por exemplo, um, dois, três ou quatro substituintes **E**. Em algumas modalidades, **E** pode ser –OH. Em algumas modalidades, **E** pode ser C_1-C_4 alquila. Em algumas modalidades,**E** pode ser C_1-C_4 haloalquila. Em algumas modalidades, **E** pode ser -O(C_1-C_4 alquila). Em algumas modalidades, **E** pode ser-O(C_1-C_4 haloalquila).

[0249] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^b}$ é -CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$, $\mathbf{R^c}$ pode ser C_{6-10} arila não substituído. Em outras modalidades, quando $\mathbf{R^b}$ é -CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$, $\mathbf{R^c}$ pode ser C_{6-10} arila substituído. Em ainda outras modalidades, quando $\mathbf{R^b}$ é -CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$, $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroaril não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos

selecionados do grupo que consiste em O, N e S. Em ainda outras modalidades, $\mathbf{R^b}$ pode ser -(C_1-C_4 alquila)-$\mathbf{R^c}$ e $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros substituído tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S. Quando uma fração $\mathbf{R^c}$ é indicada como substituída, a fração pode ser substituída por um ou mais, por exemplo, um, dois, três ou quatro substituintes **E**. Em algumas modalidades, **E** pode ser –OH. Em outras modalidades, **E** pode ser C_1-C_4 alquila. Em ainda outras modalidades, **E** pode ser C_1-C_4 haloalquila. Em ainda outras modalidades, **E** pode ser -O(C_1-C_4 alquila). Em ainda outras modalidades, **E** pode ser -O(C_1-C_4 haloalquila).

[0250] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^b}$ é -CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$, $\mathbf{R^c}$ pode ser fenila. Em outras modalidades, quando $\mathbf{R^b}$ é -CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$, $\mathbf{R^c}$ pode ser naftila. Em ainda outras modalidades, quando $\mathbf{R^b}$ é -CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$, $\mathbf{R^c}$ pode ser hidroxifenila. Em ainda outras modalidades, quando $\mathbf{R^b}$ é -CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$, $\mathbf{R^c}$ pode ser indolila.

[0251] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser hidrogênio. Em outras modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser C_{1-6} alquila não substituído. Por exemplo, em algumas modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser metila, etila, n-propila, iso-propila, n-butila, iso-butila, terc-butila, pentila (de cadeia ramificada ou linear) ou hexila (de cadeia ramificada ou linear). Em outras modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser C_{1-6} alquila substituído. Em outras modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser -NH(C_{1-4} alquila). Por exemplo, em algumas modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser -NH(CH_3), -NH(CH_2CH_3), -NH(isopropila), ou -NH(*sec*-butila). Em outras modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser -N(C_{1-4} alquila)$_2$.

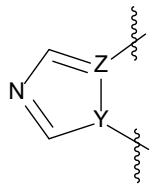
[0252] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser C_{6-10} arila não substituído. Em outras modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser C_{6-10} arila substituído. Em outras modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S. Em outras modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros substituído tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S. Quando uma fração $\mathbf{R^K}$ é

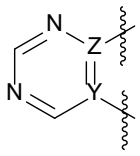
indicada como substituída, a fração pode ser substituída por um ou mais, por exemplo, um, dois, três ou quatro substituintes **Q**. Em algumas modalidades, **Q** pode ser -OH. Em outras modalidades, **Q** pode ser C_{1-4} alquila. Em ainda outras modalidades, **Q** pode ser C_{1-4} haloalquila. Em ainda outras modalidades, **Q** pode ser halo. Em ainda outras modalidades, **Q** pode ser ciano. Em ainda outras modalidades, **Q** pode ser -O-(C_{1-4} alquila). Em ainda outras modalidades, **Q** pode ser -O-(C_{1-4} haloalquila).

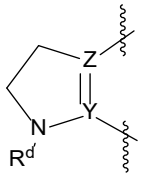
[0253] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser fenila ou naftila. Em outras modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser benzotiofenila. Em outras modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser benzotiofenila. Em outras modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser benzotiofenila. Em ainda outras modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser piridinila. Em ainda outras modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser piridinila substituído por um ou mais substituintes **Q**. Por exemplo, $\mathbf{R^K}$ pode ser metilpiridinila, etilpiridinil cianopiridinila, cloropiridinila, fluoropiridinila ou bromopiridinila.

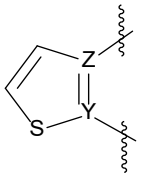
[0254] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^G}$ pode ser hidrogênio. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^G}$ pode ser C_{1-4} alquila. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^G}$ pode ser -(C_{1-4} alquil)-C(=O)NH_2.

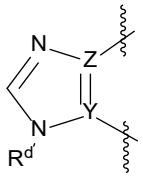
[0255] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ podem estar ausentes independentemente. Em outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ podem ser independentemente hidrogênio. Em outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ podem ser independentemente halo. Em outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ podem ser independentemente C_{1-6} alquila. Em outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ podem ser independentemente –OH. Em ainda outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ podem ser independentemente -O-(C_{1-4} alquila). Em outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ podem ser independentemente -NH(C_{1-4} alquila). Por exemplo, $\mathbf{R^Y}$ and $\mathbf{R^Z}$ podem ser independentemente -NH(CH_3), -NH(CH_2CH_3), -NH(isopropila), ou -NH(*sec*-butila). Em outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ pode ser independentemente -N(C_{1-4} alquila)$_2$.

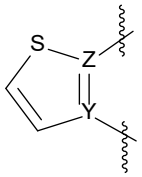
[0256] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser unidos para formar um anel. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser unidos para formar 

. Em outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser unidos para formar 

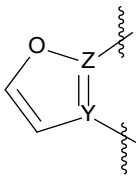
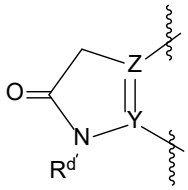
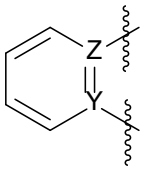
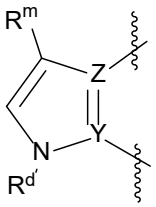
. Em outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser unidos para formar 

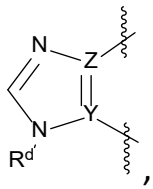
. Em ainda outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser unidos para formar 

. Em ainda outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser unidos para formar 

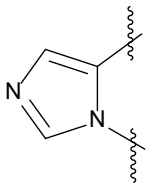
. Em outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser unidos para formar 

. Em ainda outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser

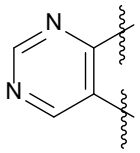
unidos para formar . Em ainda outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser unidos para formar . Em outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser unidos para formar . Em ainda outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser unidos para formar . Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser unidos para formar um anel, o anel pode ser substituído por um, dois ou três grupos independentemente selecionados de C_1-C_4 alquila, -N(C_1-C_4 alquila)$_2$, ciano, fenila não substituído e fenila substituído por 1-5 átomos de halo.

[0257] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto formam , então $\mathbf{R^J}$ pode ser -O$\mathbf{R^b}$ ou =O.

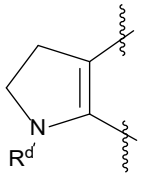
[0258] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os



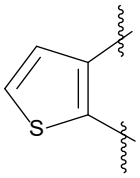
átomos aos quais estão ligados podem ser unidos para formar . Em outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os átomos aos quais



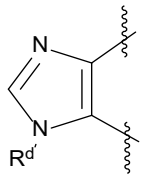
estão ligados podem ser unidos para formar . Em outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser



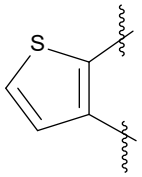
unidos para formar . Em outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser unidos para formar



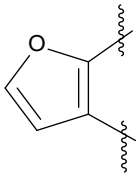
. Em outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os átomos



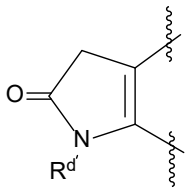
aos quais estão ligados podem ser unidos para formar . Em outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os átomos aos quais estão

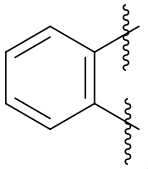
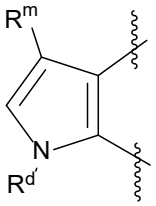


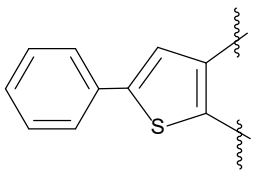
ligados podem ser unidos para formar . Em outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser unidos

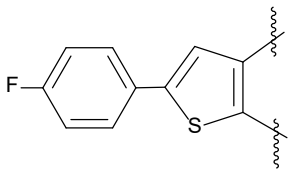


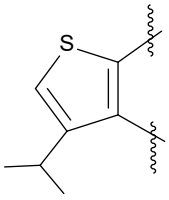
para formar . Em outras modalidades, $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser unidos para formar



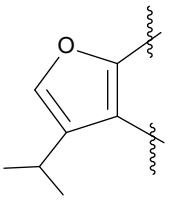
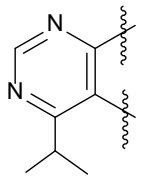
. Em outras modalidades, **R^{Y}** e **R^{Z}** tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser unidos para formar . Em outras modalidades, **R^{Y}** e **R^{Z}** tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser unidos para formar 

. Em algumas modalidades, quando **R^{Y}** e **R^{Z}** tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser unidos para formar um anel, o anel pode ser substituído por um, dois ou três grupos independentemente selecionados de C_1-C_4 alquila, -N(C_1-C_4 alquila)$_2$, ciano, fenila não substituído e fenila substituído por 1-5 átomos de halo. Em algumas modalidades, **R^{Y}** e **R^{Z}** tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser 

. Em outras modalidades, **R^{Y}** e **R^{Z}** tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser 

. Em ainda outras modalidades, **R^{Y}** e **R^{Z}** tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser 

. Em ainda outras modalidades, **R^{Y}** e**R^{Z}** tomados em conjunto com os átomos aos quais eles estão

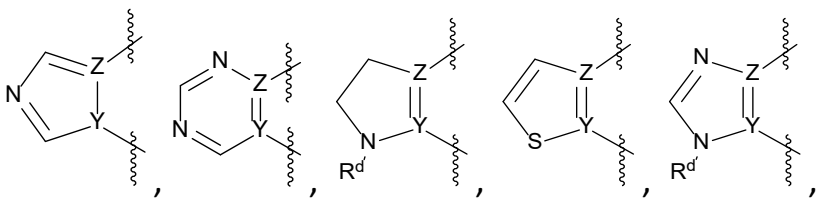
ligados podem ser . Em outras modalidades, R^Y e R^Z tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser .

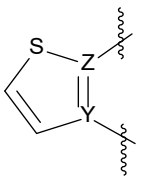
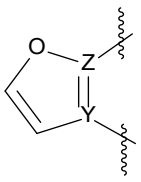
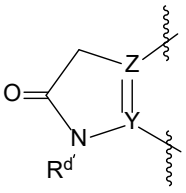
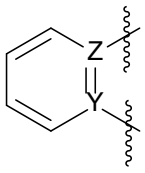
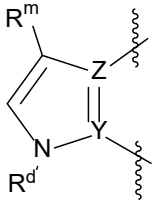
[0259] Em algumas modalidades, R^d pode ser hidrogênio. Em outras modalidades, R^d pode ser C_1-C_4 alquila. Por exemplo R^d pode ser metila, etila, n-propila, iso-propila, n-butila, iso-butila ou terc-butila. Em ainda outras modalidades, R^d pode ser halo. Em outras modalidades, R^d pode ser ciano.

[0260] Em algumas modalidades, R^m pode ser hidrogênio. Em outras modalidades, R^m pode ser C_1-C_4 alquila. Por exemplo R^m pode ser metila, etila, n-propila, iso-propila, n-butila, iso-butila ou terc-butila. Em ainda outras modalidades, R^m pode ser halo. Por exemplo, R^m pode ser flúor, cloro, bromo ou iodo. Em outras modalidades, R^m pode ser ciano.

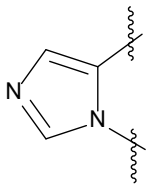
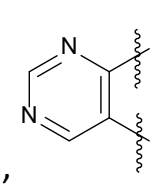
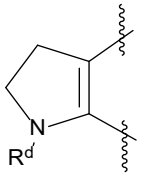
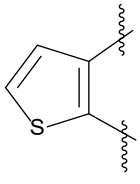
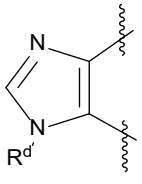
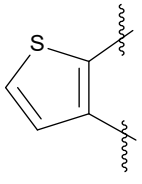
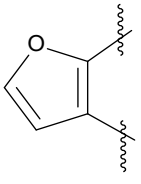
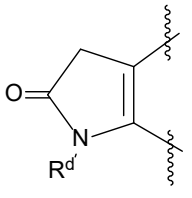
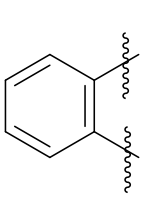
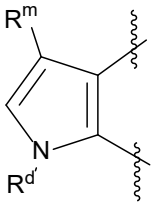
[0261] Em algumas modalidades, **X**, **Y**, e **Z** podem ser, cada um, independentemente, N ou C, em que a valência de qualquer átomo de carbono é preenchida conforme necessário com átomos de hidrogênio. Em algumas modalidades, **X** pode ser N, **Y** pode ser N e **Z** pode ser N. Em outras modalidades, **X** pode ser N, **Y** pode ser N e **Z** pode ser CH. Em algumas modalidades, **X** pode ser N, **Y** pode ser CH e **Z** pode ser N. Em ainda outras modalidades, **X** pode ser CH, **Y** pode ser N e **Z** pode ser N. Em ainda outras modalidades, **X** pode ser CH, **Y** pode ser CH e **Z** pode ser N. Em outras modalidades, **X** pode ser CH, **Y** pode ser N e **Z** pode ser CH. Em ainda outras modalidades, **X** pode ser N, **Y** pode ser CH e **Z** pode ser CH. Em outras modalidades, **X** pode ser CH, **Y** pode ser CH e **Z** pode ser CH.

[0262] Em algumas modalidades, R^a pode ser hidrogênio; R^b pode ser -(C_1-

C_4 alquil)-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: -C(=O)NH_2; C_{6-10} arila não substituído; C_{6-10} arila substituído; heteroarila não substituído de cinco a dez membros possuindo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído com 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^c}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes **E**, em que cada **E** pode ser selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila); $\mathbf{R^K}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: hidrogênio, C_{1-6} alquila não substituído; -NH(C_{1-4} alquila); -N(C_{1-4} alquila)$_2$, C_{6-10} arila não substituído; C_{6-10} arila substituído; heteroarila não substituído de cinco a dez membros possuindo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído com 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes **Q**, em que cada **Q** pode ser selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila), e -O-(C_{1-4} haloalquila); $\mathbf{R^G}$ pode ser -(C_{1-4} alquil)-C(=O)NH_2; $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ podem estar, cada um, independentemente ausentes ou ser selecionados a partir do grupo que consiste em: hidrogênio, C_{1-6} alquila, e -NH(C_{1-4} alquila); ou $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser unidos para formar um anel selecionado a partir de: 

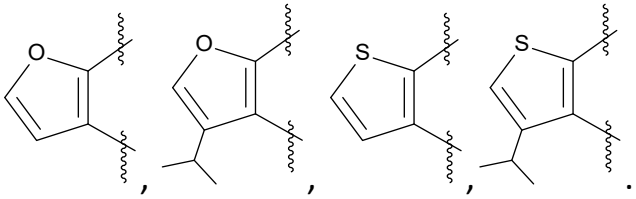





; em que o referido anel pode ser opcionalmente substituído com um, dois ou três grupos independentemente selecionados a partir de C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -OH, -O-(C_{1-4} alquila), -N(C_{1-4} alquila)$_2$, C_6-C_{10} arila não substituído, C_6-C_{10} arila substituído por 1-5 átomos halo, e -O-(C_{1-4} haloalquila); $\mathbf{R^d}$ podem ser C_1-C_4 alquila; $\mathbf{R^m}$ podem ser ciano; e **X**, **Y**, e **Z** podem ser cada um independentemente N ou C, em que a valência de qualquer átomo de carbono é preenchida conforme necessário com átomos de hidrogênio.

[0263] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser -CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: fenila não substituído, fenila substituído, indolila e -C (= O) NH_2; $\mathbf{R^K}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: hidrogênio, metila, piridinila substituído, benzotiofenila não substituído e -NH(C_1-C_4 alquila); $\mathbf{R^G}$ podem ser -CH_2CH_2-C(=O)NH_2; $\mathbf{R^Y}$ pode ser -NH(C_1-C_4 alquila); $\mathbf{R^Z}$ pode estar ausente ou ser hidrogênio; oi $\mathbf{R^Y}$ e$\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto com os átomos aos quais estão ligados podem ser unidos para formar um anel selecionado a partir de:

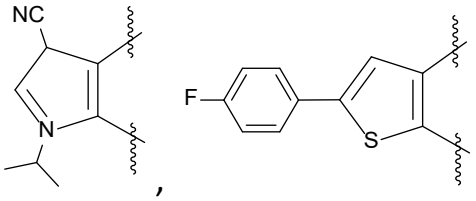










; em que o referido anel pode ser opcionalmente

substituído por um, dois ou três grupos independentemente selecionados de C_1-C_4 alquila, -N(C_1-C_4 alquila)$_2$, ciano, fenila não substituído e fenila substituído por 1-5 átomos de halo; $\mathbf{R^d}$ pode ser C_1-C_4 alquila; $\mathbf{R^m}$ pode ser ciano; e **X** pode ser N ou CH.

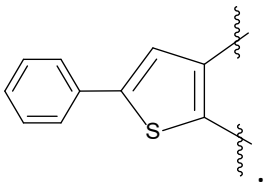
[0264] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é –N$\mathbf{R^a R^b}$; **G** pode ser N; ------ unindo **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser –CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; ou $\mathbf{R^c}$ pode ser $C_{6\text{-}10}$ arila substituído, substituído por um ou mais **E**, em que **E** é –OH; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; ou $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros substituído tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; substituído com um ou mais **Q**, em que **Q** pode ser selecionado de ciano, halo ou C_1-C_4 alquila; $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados juntos podem ser



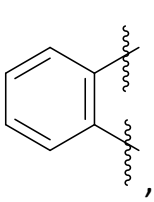
[0265] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é –N$\mathbf{R^a R^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser –CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; ou $\mathbf{R^c}$ pode ser $C_{6\text{-}10}$ arila substituído, substituído por um ou mais **E**, em que **E** é –OH; $\mathbf{R^K}$ pode ser hidrogênio, $C_{1\text{-}4}$ alquila ou heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto podem ser

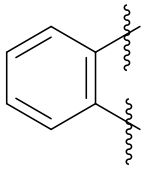


ou



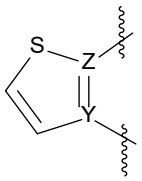
.

[0266] Em algumas modalidades, quando$\mathbf{R^J}$ é –N$\mathbf{R^aR^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser –CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; ou $\mathbf{R^c}$ pode ser C_{6-10} arila substituído, substituído por um ou mais **E**, em que **E** é –OH; $\mathbf{R^K}$ pode ser hidrogênio, C_{1-4} alquila ou heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ em conjunto podem ser 

,  ou .

[0267] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é –N$\mathbf{R^aR^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** podem ser uma ligação dupla, $\mathbf{R^a}$ podem ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser –CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser substituído C_{6-10} arila; substituído por um ou mais de **E**, em que **E** pode ser –OH; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros não substituído tendo 1-4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste em O, N, e S; $\mathbf{R^Y}$ pode ser -NH(C_{1-4} alquila); $\mathbf{R^Z}$ pode ser hidrogênio; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; **Z** pode ser C; e ------ juntando **Y** e **Z** pode ser uma ligação dupla. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I) pode ser 4-(2-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-6-(isopropilamino)pirimidin-4-il)amino)etil)fenol.

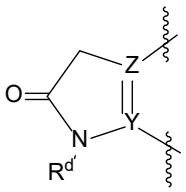
[0268] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é –N$\mathbf{R^aR^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** ode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser –CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$, $\mathbf{R^c}$ pode ser C_{6-10} arila substituído, substituído por um ou mais **E**, em que **E** pode ser –OH; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros não substituído tendo 1-4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste em O,



N, e S; $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados juntos é ; em que o anel é substituído por C_1-C_4 alquila; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto da Fórmula (I) pode ser 4-(2-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-7-isopropiltieno[3,2-*d]*pirimidin-4-il)amino)etil)fenol.

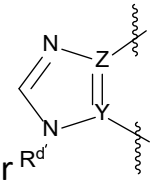
[0269] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é $-N\mathbf{R^a}\mathbf{R^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser $-CH_2CH_2$-$\mathbf{R^c}$, $\mathbf{R^c}$ C_{6-10} arila substituído, substituído por um ou mais **E**, em que **E** pode ser –OH; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados juntos é ; $\mathbf{R^d}$ pode ser C_1-C_4 alquila; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I) pode ser 4- (2 - ((2- (benzo [*b*] tiofen-3-il) -7-isopropil-6,7-diidro- 5H-pirrolo [2,3-*d*] pirimidin-4-il) amino) etil) fenol.

[0270] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é $-N\mathbf{R^a}\mathbf{R^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser $-CH_2CH_2$-$\mathbf{R^c}$, $\mathbf{R^c}$ pode ser C_{6-10} arila substituído, substituído por um ou mais **E**, em que **E** pode ser –OH; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros não substituído tendo 1-4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste em O,

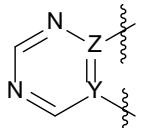


N, e S; $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados juntos é ; $\mathbf{R^d}$ pode ser C_1-C_4 alquila; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto da Fórmula (I) pode ser 2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-4-((4-

hidroxifenetil)amino)-7-isopropil-5,7-di-hidro-6*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-6-ona.

[0271] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é $-O\mathbf{R^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^b}$ pode ser $-CH_2CH_2-\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser $-C(=O)NH_2$; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros não substituído tendo 1-4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste em O, N, e S; $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados juntos podem ser 

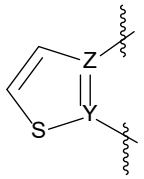
; $\mathbf{R^d}$ pode ser C_1-C_4 alquila; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** é C. Em algumas modalidades, o composto da Fórmula (I) pode ser 3-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-9-isopropil-9*H*-purin-6-il)óxi)propanamida.

[0272] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é $-N\mathbf{R^a}\mathbf{R^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^b}$ pode ser $-CH_2CH_2-\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser $C_{6\text{-}10}$ arila substituído, substituído por um ou mais **E**, em que **E** é –OH; $\mathbf{R^K}$ é heteroarila de cinco a dez membros não substituído tendo 1-4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste em O, N, e S; $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados juntos podem ser 

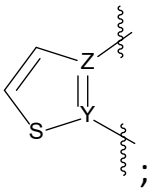
; em que o referido anel é substituído por $-N(C_{1\text{-}4}$ alquila$)_2$; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** é C. Em algumas modalidades, o composto da Fórmula (I) pode ser 4-(2-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-8-(dimetilamino)pirimido[5,4-*d*]pirimidin-4-il)amino)etil)fenol.

[0273] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é $-N\mathbf{R^a}\mathbf{R^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser $-CH_2CH_2-\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros não substituído tendo 1-4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste em O, N, e S; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros substituído tendo 1-4 átomos

selecionados a partir do grupo que consiste em O, N, e S; em que uma fração $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais **Q**, em que **Q** é ciano; $\mathbf{R^Y}$ pode ser -NH(C_{1-4} alquila); $\mathbf{R^Z}$ pode estar ausente; **J** pode ser C; **X** pode ser C; **Y** pode ser C; **Z** pode ser N; e ------ juntando **Y** e **Z** pode ser uma ligação dupla. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I) pode ser 5-(2-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)-6-(*sec*-butilamino)pirimidin-4-il)nicotinonitrila.

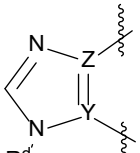
[0274] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é $-N\mathbf{R^a}\mathbf{R^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser $-CH_2CH_2-\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros não substituído tendo 1-4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste em O, N, e S; $\mathbf{R^K}$ pode ser C_{1-6} alquila não substituído; $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados juntos podem ser 

; em que o anel é substituído por C_6-C_{10} arila não substituído; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I) pode ser *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-metil-6-feniltieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina

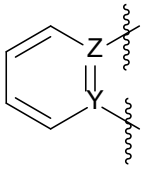
[0275] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ pode ser $-N\mathbf{R^a}\mathbf{R^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser $-CH_2CH_2-\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros não substituído tendo 1-4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste em O, N, e S; $\mathbf{R^K}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados juntos podem ser 

; em que o anel é substituído por C_6-C_{10} arila substituído; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto da Fórmula (I) pode ser N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-

amina

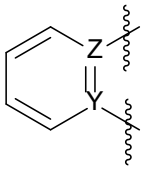
[0276] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é =O; **G** pode ser N substituído por $\mathbf{R^G}$; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação simples; $\mathbf{R^G}$ pode ser -(C_{1-4} alquil)-C(=O)NH_2; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros não substituído tendo 1-4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste em O, N, e S; $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados juntos podem ser 

; $\mathbf{R^d}$ pode ser C_1-C_4 alquila; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, composto da Fórmula (I) pode ser 3-(2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-9-isopropil-6-oxo-6,9-di-hidro-1*H*-purin-1-il)propanamida.

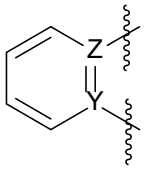
[0277] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é –N$\mathbf{R^a}\mathbf{R^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio $\mathbf{R^b}$ pode ser –CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros não substituído tendo 1-4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste em O, N, e S; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros substituído tendo 1-4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste em O, N, e S; em que uma fração $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais de **Q**, em que **Q** pode ser halo; $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados juntos podem ser 

; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e**Z** pode ser C. El algumas modalidades, o composto da Fórmula (I) pode ser *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-fluoropiridin-3-il)quinazolin-4-amina.

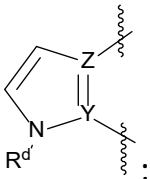
[0278] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é –N$\mathbf{R^a}\mathbf{R^b}$; **G** é N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio $\mathbf{R^b}$ pode ser –CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros não substituído tendo 1-4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste em O, N, e S; $\mathbf{R^K}$ pode ser

heteroarila de cinco a dez membros substituído tendo 1-4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste em O, N, e S; em que uma fração $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais de **Q**, em que **Q** pode ser ciano; $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados juntos são 

; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto da Fórmula (I) pode ser 5-(4-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)quinazolin-2-il)nicotinonitrila.

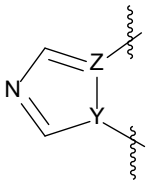
[0279] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é $-N\mathbf{R^aR^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio $\mathbf{R^b}$ pode ser $-CH_2CH_2-\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros não substituído tendo 1-4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste em O, N, e S; $\mathbf{R^K}$ pode ser -NH(C_{1-4} alquila); $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados juntos podem ser 

; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o compostos da Fórmula (I) pode ser N^4-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-N^2-(*sec*-butil)quinazolina-2,4-diamina.

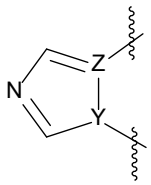
[0280] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é $-N\mathbf{R^aR^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser $-CH_2CH_2-\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser C_{6-10} arila substituído, substituído por um ou mais de **E**, em que**E** é –OH; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros não substituído tendo 1-4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste em O, N, e S; $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados juntos podem ser 

; em que o anel é substituído por ciano; $\mathbf{R^d}$ pode ser C_1-C_4 alquila; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser

C. Em algumas modalidades, o composto da Fórmula (I) pode ser 2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-4-((4-hidroxifenetil)amino)-7-isopropil-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina-5-carbonitrila.

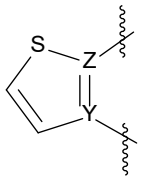
[0281] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é $-N\mathbf{R^a}\mathbf{R^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G**e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser $-CH_2CH_2-\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ juntos podem ser 

; em que o anel é substituído por C_{1-4} alquila; **J** pode ser C; **X** pode ser C; **Y** pode ser N; e **Z** pode ser C; em que a valência de qualquer átomo de carbono é preenchida conforme necessário com átomos de hidrogênio. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I) pode ser *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-6-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-3-isopropilimidazo[1,5-*a*]pirazin-8-amina.

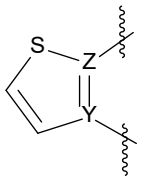
[0282] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é $-N\mathbf{R^a}\mathbf{R^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser $-CH_2CH_2-\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser C_{6-10} arila substituído, substituído por um ou mais **E**, em que **E** é –OH; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ juntos podem ser; 

em que o anel pode ser substituído por C_{1-4} alquila; **J** pode ser C; **X** pode ser C; **Y** pode ser N; e **Z** pode ser C; em que a valência de qualquer átomo de carbono é preenchida conforme necessário com átomos de hidrogênio. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I) pode ser 4-(2-

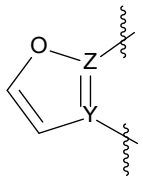
((6-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-3-isopropilimidazo[1,5-*a*]pirazin-8-il)amino)etil)fenol.

[0283] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é–N$\mathbf{R^aR^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** representa uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser –CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros substituído tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais **Q**, em que **Q** é ciano; $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto são 

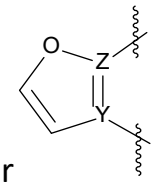
; em que o anel é substituído por C_1-C_4 alquila;**J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I) pode ser 5-(4-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)-7-isopropiltieno[3,2-*d*]pirimidin-2-il)nicotinonitrila.

[0284] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é –N$\mathbf{R^aR^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** representa uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser –CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma fração $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais **Q**, em que **Q** é halo; $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados em conjunto pode ser 

; em que o anel é substituído por C_1-C_4 alquila; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I) pode ser *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-7-isopropiltieno[3,2-*d*]pirimidina-4-amina.

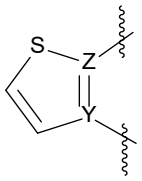
[0285] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é $-N\mathbf{R^a}\mathbf{R^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser $-CH_2CH_2-\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros substituído tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais **Q**, em que **Q** é halo; $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ juntos podem ser 

; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I) pode ser *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-fluoropiridin-3-il)furo[3,2-*d*]pirimidin-4-amina.

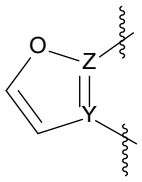
[0286] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é $-N\mathbf{R^a}\mathbf{R^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser $-CH_2CH_2-\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros substituído tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída com um ou mais **Q**, em que **Q** é C_1-C_4 alquila; $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados juntos podem ser 

; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I) pode ser *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-metilpiridin-3-il)furo[3,2-*d*]pirimidin-4-amina.

[0287] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é $-N\mathbf{R^a}\mathbf{R^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser $-CH_2CH_2-\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros

tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros substituído tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída com um ou mais**Q**, em que **Q** is C_1-C_4 alquila; $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados juntos podem ser 

; em que o anel é substituído por C_1-C_4 alquila **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I) pode ser *N*-(2- (1*H*-indol-3-il) etil) -7-isopropil-2- (5-metilpiridin-3-il) tieno [3,2-*d*] pirimidin-4-amina.

[0288] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é –N$\mathbf{R^a R^b}$; **G** é N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser –CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N, e S; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N, e S; em que uma porção $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais de **Q**, em que **Q** é ciano; $\mathbf{R^Y}$ e $\mathbf{R^Z}$ tomados juntos podem ser 

; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto da Fórmula (I) pode ser 5-(4-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)furo[3,2-*d*]pirimidin-2-il)nicotinonitrila.

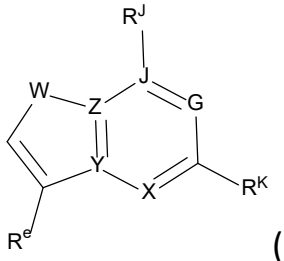
[0289] Em alguns casos, é fornecido aqui o composto de Fórmula (I), em que o composto pode ser selecionado de:

4-(2-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-6-(isopropilamino)pirimidin-4-il)amino)etil)fenol; 4-(2-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-7-isopropiltieno[3,2-*d]*pirimidin-4-il)amino)etil)fenol; 4-(2-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-7-isopropil-6,7-

di-hidro-5H-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino)etil)fenol; 2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-4-((4-hidroxifenetil)amino)-7-isopropil-5,7-di-hidro-6*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-6-ona; 3-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-9-isopropil-9*H*-purin-6-il)oxi)propanamida; 4-(2-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-8-(dimetilamino)pirimido[5,4-*d*]pirimidin-4-il)amino)etil)fenol; 5-(2-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)-6-(*sec*-butilamino)pirimidin-4-il)nicotinonitrila; N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-metil-6-feniltieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina; N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina; 3-(2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-9-isopropil-6-oxo-6,9-di-hidro-1*H*-purin-1-il)propanamida; *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-fluoropiridin-3-il)quinazolin-4-amina; 5-(4-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)quinazolin-2-il)nicotinonitrila; N^4-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-N^2-(*sec*-butil)quinazolina-2,4-diamina; 2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-4-((4-hidroxifenetil)amino)-7-isopropil-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina-5-carbonitrila; *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-6-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-3-isopropilimidazo[1,5-*a*]pirazin-8-amina; 4-(2-((6-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-3-isopropilimidazo[1,5-*a*]pirazin-8-il)amino)etil)fenol; 5-(4-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)-7-isopropiltieno[3,2-*d]*pirimidin-2-il)nicotinonitrila; *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-7-isopropiltieno[3,2-*d*]pirimidin-4-amina; *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-fluoropiridin-3-il)furo[3,2-*d*]pirimidin-4-amina; *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-metilpiridin-3-il)furo[3,2-*d*]pirimidin-4-amina; *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-7-isopropil-2-(5-metilpiridin-3-il)tieno[3,2-*d*]pirimidin-4-amina; 5-(4-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)furo[3,2-*d*]pirimidin-2-il)nicotinonitrila; e sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos.

Fórmula (I-A)

[0290] Em algumas modalidades aqui fornecidas, o composto de Fórmula

(I) pode ter a estrutura de Fórmula (I-A): 

(I-A), incluindo seus sais farmaceuticamente aceitáveis, em que: $\mathbf{R^J}$ pode ser $-N\mathbf{R^a}\mathbf{R^b}$; $\mathbf{R^a}$ pode ser hirdogênio ou C_1-C_4 alquila; $\mathbf{R^b}$ pode ser $\mathbf{R^c}$ or -(C_1-C_4 alquil)-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{6-10} arila não substituído; C_{6-10} arila substituído; heteroarila não substituído de cinco a dez membros possuindo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído com 1-4 átomos seleccionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^c}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes **E**, em que cada **E** pode ser selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila); $\mathbf{R^K}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consistem em: hidrogênio, C_{1-6} alquila não substituído; -NH(C_{1-4} alquila); -N(C_{1-4} alquila)$_2$, C_{6-10} arila não substituído; C_{6-10} arila substituído; heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarilao de cinco a dez membros substituído com 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes **Q**, em que cada **Q** pode ser selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila), e -O-(C_{1-4} haloalquila); **Y** e **Z** cada um pode ser C; **X** pode ser N ou CH; **W** pode ser O ou S; e $\mathbf{R^e}$ pode ser hidrogênio ou C_1-C_4 alquila.

[0291] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio. Em outras modalidades, $\mathbf{R^a}$ pode ser C_1-C_4 alquila.

[0292] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^b}$ pode ser -(C_1-C_4 alquil)-$\mathbf{R^c}$. Por exemplo, $\mathbf{R^b}$ pode ser -CH_2-$\mathbf{R^c}$, -CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$, -$CH_2CH_2CH_2$-$\mathbf{R^c}$, ou -$CH_2CH_2CH_2CH_2$-$\mathbf{R^c}$.

[0293] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser –OH. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser -O(C_1-C_4 alquila). Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser -O(C_1-C_4 haloalquila). Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser -C(=O)NH_2. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser C_{6-10} arila não substituído. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser C_{6-10} arila substituído. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros substituído tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S. Em algumas modalidades, quando uma fração $\mathbf{R^c}$ é indicada como substituída, a fração pode ser substituída por um ou mais, por exemplo, um, dois, três ou quatro substituintes **E**. Em algumas modalidades, **E** pode ser –OH. Em algumas modalidades, **E** pode ser C_1-C_4 alquila. Em algumas modalidades,**E** pode ser C_1-C_4 haloalquila. Em algumas modalidades, **E** pode ser -O(C_1-C_4 alquila). Em algumas modalidades, **E** pode ser -O(C_1-C_4 haloalquila). Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser fenila. Em outras modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser hidroxifenila. Em ainda outras modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser indolila.

[0294] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros com 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros substituído tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que o heteroarila substituído pode ser substituído por um ou mais substituintes **Q**, em que cada **Q** pode ser selecionado independentemente do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4}

alquila), e -O-(C_{1-4} haloalquila. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser piridinila. Em ainda outras modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser piridinila substituído por um ou mais substituintes **Q**. Por exemplo, $\mathbf{R^K}$ pode ser metilpiridinila, etilpiridinil cianopiridinila, cloropiridinila, fluoropiridinila ou bromopiridinila.

[0295] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^e}$ pode ser hidrogênio. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^e}$ pode ser C_1-C_4 alquila. Por exemplo, $\mathbf{R^e}$ pode ser metila, etila, n-propila, iso-propila, n-butila, iso-butila ou terc-butila.

[0296] Em algumas modalidades, R^a pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser -(C_1-C_4 alquila)-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{6-10} arila não substituído; C_{6-10} arila substituído; heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído com 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^c}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes **E**, em que cada **E** pode ser selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila); $\mathbf{R^K}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído com 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que o heteroarila substituído é substituído por um ou mais substituintes **Q**, em que cada **Q** pode ser independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O- (C_{1-4} alquila), e -O- (C_{1-4} haloalquila); e $\mathbf{R^e}$ pode ser C_1-C_4 alquila.

[0297] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser -(CH_2-CH_2)-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: fenila substituído e indolila não substituído; em que o fenila substituído é substituído

por um substituinte **E**, em que **E** pode ser -OH; $\mathbf{R^K}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: benzotiofenila não substituído e piridinila substituído; em que o piridinila substituído é substituído por um substituinte **Q**, em que **Q** pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{1-4} alquila, halo, e ciano; e $\mathbf{R^e}$ pode ser isopropila.

[0298] Em algumas modalidades, quando**W** é O, $\mathbf{R^J}$ pode ser –N$\mathbf{R^a R^b}$; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser -CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{6-10} arila não substituído; C_{6-10} arila substituído; heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído com 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^c}$ indicada como substituída é substituída com um ou mais substituintes **E**, em que cada **E** pode ser selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, e -O(C_1-C_4 alquila); $\mathbf{R^K}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído com 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes **Q**, em que cada **Q** pode ser independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em:- C_{1-4} alquila, halo, ciano, e -O-(C_{1-4} alquila); **Y** e **Z** cada um pode ser C; **X** pode ser N ou CH; e $\mathbf{R^e}$ pode ser hidrogênio ou C_1-C_4 alquila.

[0299] Em algumas modalidades, quando **W** é S, $\mathbf{R^J}$ pode ser–N$\mathbf{R^a R^b}$; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{6-10} arila não substituído; C_{6-10} arila substituído; heteroarila não substituídode cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído com

1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^c}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes **E**, em que cada **E** pode ser selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em:-OH, C_1-C_4 alquila, e -O(C_1-C_4 alquila); $\mathbf{R^K}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído por 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída com um ou mais substituintes **Q**, em que cada **Q** pode ser independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: - C_{1-4} alquila, halo, ciano, e -O-(C_{1-4} alquila); **Y** e **Z** pode cada um ser C; **X** pode ser N ou CH; e $\mathbf{R^e}$ podem ser hidrogênio ou C_1-C_4 alquila.

[0300] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é –N$\mathbf{R^a R^b}$; **G** pode ser N; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser –CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N, e S; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N, e S; em que uma porção $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais **Q**, em que **Q** é C_1-C_4 alquila; **W** pode ser S; $\mathbf{R^e}$ pode ser C_1-C_4 alquila; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto da Fórmula (I-A) pode ser *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-7-isopropil-2-(5-metilpiridin-3-il)tieno[3,2-*d*]pirimidin-4-amina.

[0301] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é –N$\mathbf{R^a R^b}$; **G** pode ser N; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio $\mathbf{R^b}$ pode ser –CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N, e S; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N, e S;

em que uma fração $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais de **Q**, em que **Q** é ciano; **W** pode ser S; $\mathbf{R^e}$ pode ser C_1-C_4 alquila; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto da Fórmula (I-A) pode ser 5-(4-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)-7-isopropiltieno[3,2-*d]*pirimidin-2-il)nicotinonitrila.

[0302] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é $-N\mathbf{R^aR^b}$; **G** pode ser N; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser $-CH_2CH_2$-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N, e S; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila no substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N, e S; em que uma porção $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais de **Q**, em que **Q** é halo; **W** pode ser S; $\mathbf{R^e}$ pode ser C_1-C_4 alquila; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto da Fórmula (I-A) pode ser *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-7-isopropiltieno[3,2-*d*]pirimidin-4-amina.

[0303] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é $-N\mathbf{R^aR^b}$; **G** pode ser N; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser $-CH_2CH_2$-$\mathbf{R^c}$, $\mathbf{R^c}$ pode ser $C_{6\text{-}10}$ arila substituído, substituído por um ou mais de **E**, em que **E** pode ser –OH; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N, e S; **W** pode ser S; $\mathbf{R^e}$ pode ser C_1-C_4 alquila; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto da Fórmula (I-A) pode ser 4-(2-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-7-isopropiltieno[3,2-*d]*pirimidin-4-il)amino)etil)fenol.

[0304] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é $-N\mathbf{R^aR^b}$; **G** pode ser N; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser $-CH_2CH_2$-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros

substituído tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma a porção $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais **Q**, em que **Q** é halo; **W** pode ser O; $\mathbf{R^e}$ pode ser hidrogênio; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I-A) pode ser *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-fluoropiridin-3-il)furo[3,2-*d*]pirimidin-4-amina.

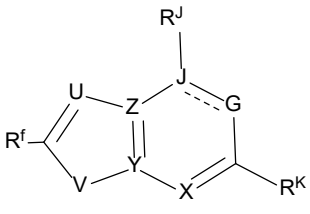
[0305] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é $-N\mathbf{R^aR^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser $-CH_2CH_2$-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N, e S; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N, e S; em que uma porção $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais de **Q**, em que **Q** é C_1-C_4 alquila; **W** pode ser O; $\mathbf{R^e}$ pode ser hidrogênio; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e**Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto da Fórmula (I-A) pode ser *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-metilpiridin-3-il)furo[3,2-*d*]pirimidin-4-amina.

[0306] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é $-N\mathbf{R^aR^b}$; **G** é $N\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser $-CH_2CH_2$-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N, e S; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N, e S; em que uma fração $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais de **Q**, em que **Q** é ciano; **W** pode ser O; $\mathbf{R^e}$ pode ser hidrogênio; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto da Fórmula (I-A) pode ser 5-(4-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)furo[3,2-*d*]pirimidin-2-il)nicotinonitrila.

[0307] Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I-A), ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, pode ser selecionado a partir do grupo

que consiste em: *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-7-isopropil-2-(5-metilpiridin-3-il)tieno[3,2-*d*]pirimidin-4-amina; 5-(4-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)-7-isopropiltieno[3,2-*d*]pirimidin-2-il)nicotinonitrila; *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-7-isopropiltieno[3,2-*d*]pirimidin-4-amina; 4-(2-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-7-isopropiltieno[3,2-*d*]pirimidin-4-il)amino)etil)fenol; *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-fluoropiridin-3-il)furo[3,2-*d*]pirimidin-4-amina; N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-metilpiridin-3-il)furo[3,2-*d*]pirimidin-4-amina; e 5-(4-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)furo[3,2-*d*]pirimidin-2-il)nicotinonitrila.

Fórmula (I-B)

[0308] Em outras modalidades aqui fornecidas, o composto de Fórmula (I) pode ter a estrutura de Fórmula (I-B):  (I-B) incluindo seus sais farmaceuticamente aceitáveis, em que: $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio ou C_1-C_4 alquila; $\mathbf{R^b}$ pode ser $\mathbf{R^c}$ ou -(C_1-$_4$ alquil)-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, -O(C_1-C_4 alquila), -O(C_1-C_4 haloalquila); -C(=O)NH_2; C_{6-10} arila não substituído; C_{6-10} arila substituído; aheteroarilo não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído por 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^c}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes **E**, em que cada **E** pode ser selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila); $\mathbf{R^K}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: hidrogênio, C_{1-6} alquila; C_{1-6} alquila substituído; -NH(C_{1-4} alquila); -N(C_{1-4} alquil)$_2$, C_{6-10} arila não substituído; C_{6-10} arila substituído; heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e

heteroarila de cinco a dez membros substituído por 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes **Q**, em que cada **Q** pode ser selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila), e -O-(C_{1-4} haloalquila); $\mathbf{R^G}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, C_{1-4} alquila, e -(C_{1-4} alquil)-C(=O)NH_2; $\mathbf{R^f}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, C_{1-4} alquila, C_6-C_{10} arila não substituído, e C_6-C_{10} arila substituído por 1-5 átomos de halo; **U** pode ser N ou C$\mathbf{R^U}$; **V** pode ser S ou N$\mathbf{R^V}$; $\mathbf{R^U}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, C_{1-4} alquila, halo, e ciano; $\mathbf{R^V}$ pode ser hidrogênio ou C_1-C_4 alquila; em que quando **U** é C$\mathbf{R^U}$ e V é N$\mathbf{R^V}$, $\mathbf{R^U}$ é selecionado a partir do grupo que consiste em C_{1-4} alquila, halo, e ciano; **Y** e **Z** pode cada um ser C; e **X** pode ser N ou CH.

[0309] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio. Em outras modalidades, $\mathbf{R^a}$ pode ser C_1-C_4 alquila.

[0310] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^b}$ pode ser -(C_1-C_4 alquil)-$\mathbf{R^c}$. Por exemplo, $\mathbf{R^b}$ pode ser -CH_2-$\mathbf{R^c}$, -CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$, -$CH_2CH_2CH_2$-$\mathbf{R^c}$, ou -$CH_2CH_2CH_2CH_2$-$\mathbf{R^c}$. Em certas modalidades, $\mathbf{R^b}$ pode ser -(CH_2CH_2)-$\mathbf{R^c}$. Em certas modalidades, $\mathbf{R^b}$ pode ser -(CH_2CH_2)-C(=O)NH_2. Em certas modalidades, $\mathbf{R^b}$ pode ser-(CH_2CH_2)-(indolila). Em certas modalidades, $\mathbf{R^b}$ pode ser -(CH_2CH_2)-(hidroxifenila).

[0311] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser –OH. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser -O(C_1-C_4 alquila). Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser -O(C_1-C_4 haloalquila). Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser -C(=O)NH_2. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser C_{6-10} arila não substituído. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser C_{6-10} arila substituído. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^c}$

pode ser heteroarila de cinco a dez membros substituído tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S. Em algumas modalidades, quando uma fração $\mathbf{R^c}$ é indicada como substituída, a fração pode ser substituída por um ou mais, por exemplo, um, dois, três ou quatro substituintes **E**. Em algumas modalidades, **E** pode ser –OH. Em algumas modalidades, **E** pode ser C_1-C_4 alquila. Em algumas modalidades, **E** pode ser C_1-C_4 haloalquila. Em algumas modalidades, **E** pode ser -O(C_1-C_4 alquila). Em algumas modalidades, **E** pode ser-O(C_1-C_4 haloalquila).

[0312] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser hidrogênio. Em outras modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser C_1-C_4 alquila. Por exemplo, $\mathbf{R^K}$ pode ser metila, etila, n-propila, iso-propila, n-butila, iso-butila ou terc-butila. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser selecionado do grupo que consiste em: heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído por 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que o heteroarila substituído pode ser substituído por um ou mais substituintes **Q**, em que cada **Q** pode ser selecionado independentemente do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila), e -O-(C_{1-4} haloalquila). Em certas modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser benzotiofenila. Em outras modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser piridinil substituído por um ou mais substituintes **Q**. Por exemplo, $\mathbf{R^K}$ pode ser metilpiridinil, etilpiridinil cianopiridinil, cloropiridinil, fluoropiridinil ou bromopiridinil.

[0313] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^G}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, C_{1-4} alquila, e -(C_{1-4} alquil)-C(=O)NH_2. Em certas modalidades, $\mathbf{R^G}$ pode ser -(CH_2CH_2)-C(=O)NH_2.

[0314] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^f}$ pode ser hidrogênio. Em outras modalidades, $\mathbf{R^f}$ pode ser C_{1-4} alquila. Por exemplo, $\mathbf{R^f}$ pode ser metila, etila, n-

propila, iso-propila, n-butila, iso-butila ou terc-butila. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^f}$ pode ser C_6-C_{10} arila não substituído. Em outras modalidades, $\mathbf{R^f}$ pode ser C_6-C_{10} arila substituído por 1-5 átomos halo. Em certas modalidades, $\mathbf{R^f}$ pode ser fenila substituído por 1-5 átomos halo. Em certas modalidades, $\mathbf{R^f}$ pode ser fluorofenila.

[0315] Em algumas modalidades, **U** pode ser N. Em outras modalidades, **U** pode ser C$\mathbf{R^U}$.

[0316] Em algumas modalidades, **V** pode ser S. Em outras modalidades, **V** pode ser N$\mathbf{R^V}$.

[0317] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^U}$ pode ser hidrogênio. Em algumas modalidades, $\mathbf{R^U}$ pode ser C_{1-4} alquila. Em outras modalidades $\mathbf{R^U}$ pode ser halo. Por exemplo, $\mathbf{R^U}$ pode ser flúor, cloro, bromo ou iodo. Em ainda outras modalidades, $\mathbf{R^U}$ pode ser ciano.

[0318] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^V}$ pode ser hidrogênio. Em outras modalidades $\mathbf{R^V}$ pode ser C_{1-4} alquila. Por exemplo, $\mathbf{R^V}$ pode ser metila, etila, n-propila, iso-propila, n-butila, iso-butila ou terc-butila. Em algumas modalidades, **Y** e **Z** podem ser C e **X** podem ser N. Em outras modalidades, **Y** e **Z** podem ser C e **X** podem ser CH.

[0319] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser -(C_{1-4} alquil)-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em:-C(=O)NH_2, C_{6-10} arila não substituído; C_{6-10} arila substituído; heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído por 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^c}$ indicada como substituída pode ser substituída por um ou mais substituintes **E**, em que cada **E** pode ser independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila);

$\mathbf{R^K}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído por 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que o heteroarila substituído é substituído por um ou mais substituintes **Q**, em que cada **Q** pode ser independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila), e -O-(C_{1-4} haloalquila); $\mathbf{R^G}$ é C_{1-4} alquila ou -(C_{1-4} alquil)-C(=O)NH_2; $\mathbf{R^f}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, fenila não substituído e fenila substituído por 1-5 átomos de halo; **Y** e **Z** cada um pode ser C; e **X** pode ser CH.

[0320] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser -(CH_2-CH_2)-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: -C (= O) NH_2, fenila substituído e indolila não substituído; em que o fenila substituído é substituído com um substituinte **E**, em que **E** pode ser -OH; $\mathbf{R^K}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: benzotioenila não substituído e piridinila substituído; em que o piridinila substituído é substituído por um substituinte **Q** , em que **Q** pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{1-4} alquila, halo e ciano; $\mathbf{R^G}$ pode ser -(CH_2CH_2)-C(=O)NH_2; $\mathbf{R^f}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, fenila e fluorofenila; **Y** e **Z** cada um pode ser C; e **X** pode ser CH.

[0321] Em algumas modalidades, quando **V** é S, $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio ou C_1-C_4 alquila; $\mathbf{R^b}$ pode ser $\mathbf{R^c}$ ou -(CH_2-CH_2)-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: -C (= O) NH_2; C_{6-10} arila não substituído; C_{6-10} arila substituído; heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído com 1-4 átomos seleccionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^c}$ indicada como substituída é substituída com

um ou mais substituintes **E**, em que cada **E** pode ser selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em:-OH, C_1-C_4 alquila, e -O(C_1-C_4 alquila); $\mathbf{R^K}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: hidrogênio, C_{1-6} alquila não substituído; C_{1-6} alquila substituído; -NH(C_{1-4} alquila); e -N(C_{1-4} alquila)$_2$; em que uma porção $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes **Q** , em que cada **Q** pode ser independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, halo, ciano, e -O-(C_{1-4} alquila; $\mathbf{R^G}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, C_{1-4} alquila, e -(C_{1-4} alquil)-C(=O)NH_2; $\mathbf{R^f}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, C_{1-4} alquila, C_6-C_{10} arila não substituído, e C_6-C_{10} arila substituído por 1-5 átomos de halo; **U** pode ser C$\mathbf{R^U}$; $\mathbf{R^U}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio C_{1-4} alquila, halo, e ciano; **Y** e **Z** pode cada um ser C; e **X** pode ser N.

[0322] Em algumas modalidades, quando **V** é N$\mathbf{R^V}$, $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio ou C_1-C_4 alquila; $\mathbf{R^b}$ pode ser $\mathbf{R^c}$ ou -(CH_2-CH_2)-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: -C (= O) NH_2; C_{6-10} arila não substituído; C_{6-10} arila substituído; heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído por 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma fração $\mathbf{R^c}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes **E**, em que cada **E** pode ser independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4, e -O(C_1-C_4 alquila); $\mathbf{R^K}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{6-10} arila não substituído; C_{6-10} arila substituído; heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído por 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^K}$ indicada como

substituída é substituída por um ou mais substituintes **Q**, em que cada **Q** pode ser independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: --OH, C_{1-4} alquila, halo, ciano, e -O-(C_{1-4} alquila); $\mathbf{R^G}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, C_{1-4} alquila, e -(C_{1-4} alquil)-C(=O)NH_2; $\mathbf{R^f}$ pode ser hidrogênio; **U** pode ser N ou C$\mathbf{R^U}$; $\mathbf{R^U}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em C_{1-4} alquila, halo, e ciano; $\mathbf{R^V}$ pode ser hidrogênio ou C_1-C_4 alquila; **Y** e **Z** pode ser cada um C; e **X** pode ser N ou CH.

[0323] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é –O$\mathbf{R^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^b}$ can be –CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser -C(=O)NH_2; $\mathbf{R^K}$ pode heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; **U** pode N; **V** pode ser N$\mathbf{R^v}$; $\mathbf{R^v}$ pode ser C_1-C_4 alquila; $\mathbf{R^f}$ pode ser hidrogênio; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I-B) pode ser 3 - ((2- (benzo [*b*] tiofen-3-il)-9-isopropil-9*H*-purin-6-il) óxi) propanamida.

[0324] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é = O; **G** pode ser N substituído por $\mathbf{R^G}$; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação simples; $\mathbf{R^G}$ pode ser -(C_{1-4} alquil)-C(=O)NH_2; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; **U** pode N; **V** pode ser N$\mathbf{R^v}$; $\mathbf{R^v}$ pode ser C_1-C_4 alquila; $\mathbf{R^f}$ pode ser hidrogênio; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I-B) pode ser 3-(2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-9-isopropil-6-oxo-6,9-di-hidro-1*H*-purin-1-il)propanamida.

[0325] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é –N$\mathbf{R^a}\mathbf{R^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser –CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser C_{6-10} arila substituído, substituído por um ou mais de **E**, em que **E** é –OH; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros

tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N, e S; **U** pode ser C**R**^{u}; **R**^{u} pode ser ciano; **V** pode ser N**R**^{v}; **R**^{v} pode ser C_1-C_4 alquila; **R**^{f} pode ser hidrogênio; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto da Fórmula (I-B) pode ser 2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-4-((4-hidroxifenetil)amino)-7-isopropil-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina-5-carbonitrila.

[0326] Em algumas modalidades, quando **R**^{J} é –N**R**^{a}**R**^{b}; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; **R**^{a} pode ser hidrogênio; **R**^{b} pode ser –CH_2CH_2-**R**^{c}; **R**^{c} pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; **R**^{K} pode ser C_{1-6} alquila; **U** pode ser C**R**^{u}; **R**^{u} pode ser hidrogênio; **V** pode ser S; **R**^{f} pode ser fenila; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I-B) pode ser *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2metil-6-feniltieno[2,3-*d*]pirimidina-4-amina.

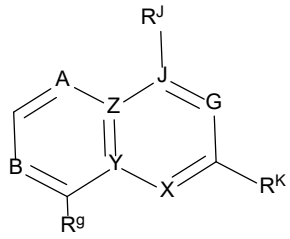
[0327] Em algumas modalidades, quando **R**^{J} pode ser –N**R**^{a}**R**^{b}; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; **R**^{a} pode ser hidrogênio; **R**^{b} pode ser –CH_2CH_2-**R**^{c}; **R**^{c} pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; **R**^{K} pode ser hidrogênio; **U** pode ser C**R**^{u}; **R**^{u} pode ser hidrogênio; **V** pode ser S; **R**^{f} pode ser fluorofenila; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I-B) pode ser N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-6-(4-fluorofenil) ieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina.

[0328] Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I-B), ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, pode ser selecionado do grupo que consiste em: 3-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-9-isopropil-9*H*-purin-6-il)oxi)propanamida; 3-(2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-9-isopropil-6-oxo-6,9-di-hidro-1H-purin-1-il)propanamida; 2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-4-((4-hidroxifenetil)amino)-7-isopropil-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina-5-carbonitrila; *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-

metil-6-feniltieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina; e *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina.

Fórmula (I-C)

[0329] Em ainda outras modalidades fornecidas neste documento, o composto de Fórmula (I) pode ter a estrutura de Fórmula (I-C):



(I-C), incluindo seus sais farmaceuticamente aceitáveis, em que: $\mathbf{R^J}$ pode ser $-N\mathbf{R^a}\mathbf{R^b}$; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio ou C_1-C_4 alquila; $\mathbf{R^b}$ pode ser $\mathbf{R^c}$ ou -(C_1-C_4 alquil)-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{6-10} arila não substituído; C_{6-10} arilal substituído; heteroarila não substituído de cinco a dez membros possuindo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído com 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^c}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes **E**, em que cada **E** pode ser selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila); $\mathbf{R^K}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: hidrogênio, C_{1-6} alquila não substituído;-NH(C_{1-4} alquila); -N(C_{1-4} alquila)$_2$, C_{6-10} arila não substituído; C_{6-10} arila substituído; heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído por 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes **Q**, em que cada **Q** pode ser selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila), e -O-(C_{1-4} haloalquila); **A** pode ser N ou

CH; **B** pode ser N ou CH; $\mathbf{R^g}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, C_{1-4} alquila, e -N(C_{1-4} alquila)$_2$; **Y** e **Z** cada um pode ser C; e **X** pode ser N ou CH.

[0330] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser -NH(C_{1-4} alquila). Por exemplo, em algumas modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser -NH(CH_3), -NH(CH_2CH_3), -NH(isopropila), ou -NH(*sec*-butila). Em algumas modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser benzotiofenila não substituído. Em outras modalidades, $\mathbf{R^K}$ pode ser piridinila substituído. Por exemplo, $\mathbf{R^K}$ pode ser metilpiridinila, etilpiridinila, cianopiridinila, cloropiridinila, fluoropiridinila ou bromopiridinila.

[0331] Em algumas modalidades, **A** pode ser N e **B** pode ser N. Em outras modalidades, **A** pode ser N e **B** pode ser CH. Em ainda outras modalidades, **A** pode ser CH e **B** pode ser N. Em ainda outras modalidades, **A** pode ser CH e **B** pode ser CH.

[0332] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^g}$ pode ser hidrogênio. Em outras modalidades, $\mathbf{R^g}$ pode ser -N(C_{1-4} alquila)$_2$. Em certas modalidades, $\mathbf{R^g}$ pode ser -N(CH_3)$_2$.

[0333] Em algumas modalidades, R^a pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser -(C_1-C_4 alquil)-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{6-10} aria não substituído; C_{6-10} arila substituído; heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído por 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^c}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes **E**, em que cada **E** pode ser selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila); $\mathbf{R^K}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em:-NH(C_{1-4} alquila); heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo

que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído por 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que o heteroarila substituído é substituído por um ou mais substituintes **Q**, em que cada **Q** pode ser independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila), e -O-(C_{1-4} haloalquila); e $\mathbf{R^g}$ pode ser hidrogênio ou -N(C_{1-4} alquila)$_2$.

[0334] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser -(C_1-C_4 alquil)-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: fenila substituído e indolila não substituído; em que o fenila substituído é substituído por um ou mais substituintes **E**, em que cada **E** pode ser selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila); $\mathbf{R^K}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: -NH(C_{1-4} alquila); benzotiofenila não substituído; e piridinila substituído; em que o piridinila substituído é substituído por um ou mais substituintes **Q**, em que cada **Q** pode ser independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em:-OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila), e -O-(C_{1-4} haloalquila); e $\mathbf{R^g}$ pode ser hidrogênio ou -N(C_{1-4} alquila)$_2$.

[0335] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser -(CH_2CH_2)-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: fenila substituído e indolila não substituído; em que o fenila substituído é substituído por um substituinte **E**, em que **E** pode ser -OH; $\mathbf{R^K}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: -NH (*sec-butil*); benzotioenila não substituído e piridinila substituído; em que o piridinila substituído é substituído com um ou mais substituintes **Q**, em que cada **Q** pode ser selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em: C_{1-4} alquila, halo, e ciano; e $\mathbf{R^g}$ pode ser hidrogênio ou -N(CH_3)$_2$.

[0336] Em algumas modalidades, quando **A** é C e **B** é C, $\mathbf{R^J}$ pode ser –N$\mathbf{R^aR^b}$; **G** pode ser N; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser –CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser C_{6-10} arila substituído, substituído por um ou mais **E**, em que **E** é –OH; ou heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N, e S; $\mathbf{R^g}$ pode ser hidrogênio; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** é C.

[0337] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é –N$\mathbf{R^aR^b}$; **G** pode ser N; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser –CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser C_{6-10} arila substituído, substituído por um ou mais **E**, em que **E** é –OH; $\mathbf{R^K}$ é heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; **A** pode ser N; **B** pode ser N; $\mathbf{R^g}$ pode ser -N(C_{1-4} alquila)$_2$; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** é C. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I-C) pode ser 4- (2 - ((2- (benzo [*b*] tiofen-3-il) -8- (dimetilamino) pirimido [5,4-*d*] pirimidin-4-il) amino) etil) fenol.

[0338] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é –N$\mathbf{R^aR^b}$; **G** pode ser N; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio $\mathbf{R^b}$ pode ser –CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila de cinco a dez membros substituído tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais **Q**, em que **Q** pode ser halo; **A** pode ser CH; **B** pode ser CH; $\mathbf{R^g}$ pode ser hidrogênio; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I-C) pode ser *N*-(2- (1*H*-indol-3-il) etil) -2- (5-fluoropiridin-3-il) quinazolin-4 -amina.

[0339] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é –N$\mathbf{R^aR^b}$; **G** é N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio $\mathbf{R^b}$ pode ser –CH_2CH_2-

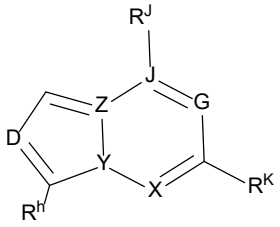
R^c; **R^c** pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; **R^K** pode ser heteroarila de cinco a dez membros substituído tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma a porção **R^K** indicada como substituída é substituída por um ou mais **Q**, em que **Q** pode ser ciano; **A** pode ser CH; **B** pode ser CH; **R^g** pode ser hidrogênio; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (IC) pode ser 5- (4 - ((2-(1*H*-indol-3-il) etil) amino) quinazolin-2-il) nicotinonitrila.

[0340] Em algumas modalidades, quando **R^J** é –N**R^aR^b**; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; **R^a** pode ser hidrogênio **R^b** pode ser –CH_2CH_2-**R^c**; **R^c** pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; **R^K** pode ser -NH(C_{1-4} alquila); **A** pode ser CH; **B** pode ser CH; **R^g** pode ser hidrogênio; **J** pode ser C; **X** pode ser N; **Y** pode ser C; e **Z** pode ser C. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I-C) pode ser N^{4-}(2- (1*H*-indol-3-il) etil)N^{2-}(*sec*-butil)quinazolina-2,4-diamina.

[0341] Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I-C), ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: 4-(2-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-8-(dimetilamino)pirimido[5,4-*d*]pirimidin-4-il)amino)etil)fenol; *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-fluoropiridin-3-il)quinazolin-4-amina; 5-(4-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)quinazolin-2-il)nicotinonitrila; e N^{4-}(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-N^{2-}(sec-butil)quinazolina-2,4-diamina.

Fórmula (I-D)

[0342] Em ainda outras modalidades aqui fornecidas, o composto de

Fórmula (I) pode ter a estrutura de Fórmula (I-D):  (I-D), incluindo seus sais farmaceuticamente aceitáveis, em que: $\mathbf{R^J}$ pode ser $-N\mathbf{R^a}\mathbf{R^b}$; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio ou C_1-C_4 alquila; $\mathbf{R^b}$ pode ser $\mathbf{R^c}$ ou -(C_{1-4} alqui)-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{6-10} arila não substituído; C_{6-10} arila substituído; heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído com 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^c}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes **E**, em que cada **E** pode ser selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em:-OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila); $\mathbf{R^K}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em C_{6-10} arila não substituído; C_{6-10} arila substituído; heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído por 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes **Q**, em que cada **Q** pode ser selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila), e -O-(C_{1-4} haloalquila); $\mathbf{R^h}$ pode ser hidrogênio ou C_{1-4} alquila; **D** pode ser N ou CH; **Y** pode ser N; **Z** pode ser C; e **X** pode ser N ou CH.

[0343] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^h}$ pode ser hidrogênio. Em outras modalidades, $\mathbf{R^h}$ pode ser C_{1-4} alquila. Por exemplo, $\mathbf{R^h}$ pode ser metila, etila, n-propila, iso-propila, n-butila, iso-butila ou terc-butila.

[0344] Em algumas modalidades, **D** pode ser N. Em outras modalidades, **D**

pode ser CH.

[0345] Em algumas modalidades, quando **D** é N, **Y** pode ser N, **Z** pode ser C e **X** pode ser N. Em outras modalidades, quando **D** é N, **Y** pode ser N, **Z** pode ser C e **X** pode ser CH. Em algumas modalidades, quando **D** é CH, **Y** pode ser N, **Z** pode ser C e **X** pode ser N. Em outras modalidades, quando **D** é CH, **Y** pode ser N, **Z** pode ser C e **X** pode ser CH.

[0346] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser-(C_{1-4} alquil)-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{6-10} arila não substituído; C_{6-10} arila substituído; heteroarila não substituído de cinco a dez membros possuindo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído por 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção $\mathbf{R^c}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes **E**, em que cada **E** pode ser selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila); $\mathbf{R^K}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{6-10} arila não substituído; C_{6-10} arila substituído; heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído com 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma a porção $\mathbf{R^K}$ indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes **Q**, em que cada **Q** pode ser selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila), e -O-(C_{1-4} haloalquila); e $\mathbf{R^h}$ pode ser hidrogênio ou C_{1-4} alquila.

[0347] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser -(C_1-C_4 alquil)-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: fenila substituído e indolila não substituído; em que o fenila substituído é substituído

por um ou mais substituintes **E**, em que cada **E** pode ser selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila); $\mathbf{R^K}$ pode ser benzotiofenila não substituído; e $\mathbf{R^h}$ pode ser hidrogênio ou C_{1-4} alquila.

[0348] Em algumas modalidades, $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser -(CH_2-CH_2)-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: fenila substituído e indolila não substituído; em que o fenila substituído é substituído por um substituinte **E**, em que **E** pode ser -OH; $\mathbf{R^K}$ pode ser benzotiofenila não substituído; e $\mathbf{R^h}$ pode ser hidrogênio ou C_{1-4} alquila.

[0349] Em algumas modalidades, quando **D** é N; $\mathbf{R^J}$ é –N$\mathbf{R^a R^b}$; **G** pode ser N; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser –CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; ou C_{6-10} arila substituído, substituído por um ou mais **E**, em que **E** é –OH; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; $\mathbf{R^h}$ pode ser C_{1-4} alquila; **J** pode ser C; **X** pode ser C; **Y** pode ser N; e **Z** pode ser C; em que a valência de qualquer átomo de carbono é preenchida conforme necessário com átomos de hidrogênio.

[0350] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ é –N$\mathbf{R^a R^b}$; **G** pode ser N; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser –CH_2CH_2-$\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S ou C_{6-10} arila substituído, substituído com um ou mais **E**, em que**E** é -OH; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; **D** pode ser N; $\mathbf{R^h}$ pode ser C_{1-4} alquila; **J** pode ser C; **X** pode ser C; **Y** pode ser N; e **Z** pode ser C; em que a valência de qualquer átomo de carbono é preenchida conforme necessário com átomos de hidrogênio. Em algumas modalidades, o

composto de Fórmula (I-D) pode ser *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-6-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-3-isopropilimidazo[1,5-*a*]pirazin-8-amina.

[0351] Em algumas modalidades, quando $\mathbf{R^J}$ is $-N\mathbf{R^a}\mathbf{R^b}$; **G** pode ser N; ------ juntando **G** e **J** pode ser uma ligação dupla; $\mathbf{R^a}$ pode ser hidrogênio; $\mathbf{R^b}$ pode ser $-CH_2CH_2-\mathbf{R^c}$; $\mathbf{R^c}$ pode ser C_{6-10} arila substituído, substituído por um ou mais **E**, em que **E** é –OH; $\mathbf{R^K}$ pode ser heteroarila não substituído de cinco a dez membros tendo 1-4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; **D** pode ser N; $\mathbf{R^h}$ pode ser C_{1-4} alquila; **J** pode ser C; **X** pode ser C; **Y** pode ser N; e **Z** pode ser C; em que a valência de qualquer átomo de carbono é preenchida conforme necessário com átomos de hidrogênio. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I-D) pode ser 4-(2-((6-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-3-isopropilimidazo[1,5-*a*]pirazin-8-il)amino)etil)fenol.

[0352] Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I-D), ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-6-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-3-isopropilimidazo[1,5-*a*]pirazin-8-amina; e 4-(2-((6-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-3-isopropilimidazo[1,5-*a*]pirazin-8-il)amino)etil)fenol.

[0353] Os compostos aqui apresentados podem ser enantiomericamente puros, como um único enantiômero ou um dastereoisômero único, ou ser misturas estereoisoméricas, tais como uma mistura de enantiômeros, *por exemplo*, uma mistura racêmica de dois enantiômeros; ou uma mistura de dois ou mais dastereoisômero. Como tal, os versados na técnica compreenderão que a administração de um composto na sua forma (*R*) é equivalente, para compostos que passam por epimerização *in vivo*, a administração do composto na sua forma (*S*). Técnicas convencionais para a preparação/isolamento dos enantiômeros individuais incluem a síntese de um precursor opticamente puro apropriado, síntese assimétrica de matérias-primas aquirais, ou resolução de

uma mistura enantiomérica, por exemplo, cromatografia quiral, recristalização, resolução, formação de sal diastereomérico, ou derivatização em adutos diastereoméricos seguido por separação.

5.4. Isolamento de Células NK

[0354] Os métodos de isolamento de células exterminadoras naturais são conhecidos na técnica e podem ser usados para isolar as células exterminadoras naturais, *por exemplo*, células NK produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito. Por exemplo, as células NK podem ser isoladas ou enriquecidas, por exemplo, pela coloração de células, em uma modalidade, com anticorpos para CD56 e CD3, e seleção de células $CD56^+$ $CD3^-$. Em certas modalidades, as células NK são enriquecidas para células $CD56^+CD3^-$ em comparação com o total de células produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito. As células NK, *por exemplo*, células produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito, podem ser isoladas usando um kit comercialmente disponível, por exemplo, o NK Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec). As células NK, *por exemplo*, células produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito, também podem ser isoladas ou enriquecidas pela remoção de células que não sejam células NK em uma população de células que compreendem as células NK, *por exemplo*, células produzidas usando os três métodos de estágio, aqui descrito. Por exemplo, células NK, *por exemplo*, células produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito, podem ser isoladas ou enriquecidas por depleção de células que exibem marcadores de células não NK usando, *por exemplo*, anticorpos para um ou mais de CD3, CD4, CD14, CD19, CD20, CD36, CD66b, CD123, HLA DR e/ou CD235a (glicoforina A). O isolamento negativo pode ser realizado usando um kit comercialmente disponível, *por exemplo*, o NK Cell Negative Isolation Kit (Dynal Biotech). As células isoladas por esses métodos podem ser classificadas adicionalmente, *por exemplo*, para separar células

CD11a + e CD11a- e/ou células CD117 + e CD117- e/ou células $CD16^+$ e células $CD16^-$ e/ou $CD94^+$ e $CD94^-$. Em certas modalidades, as células, *por exemplo*, células produzidas pelos métodos de três etapas aqui descritos, são classificadas para separar células CD11a + e CD11a-. Em modalidades específicas, as células CD11a + são isoladas. Em certas modalidades, as células são enriquecidas para células $CD11a^+$ em comparação com o total de células produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito. Em modalidades específicas, as células CD11a- são isoladas. Em certas modalidades, as células são enriquecidas para células CD11a- em comparação com o total de células produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito. Em certas modalidades, as células são classificadas para separar células CD117 + e CD117-. Em modalidades específicas, as células CD117 + são isoladas. Em certas modalidades, as células são enriquecidas para células $CD117^+$ em comparação com o total de células produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito. Em modalidades específicas, as células CD117- são isoladas. Em certas modalidades, as células são enriquecidas para células CD117- em comparação com o total de células produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito. Em certas modalidades, as células são classificadas para separar células $CD16^+$ e $CD16^-$. Em modalidades específicas, as células $CD16^+$ são isoladas. Em certas modalidades, as células são enriquecidas para células $CD16^+$ em comparação com o total de células produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito. Em modalidades específicas, as células $CD16^-$ são isoladas. Em certas modalidades, as células são enriquecidas para células CD16- em comparação com o total de células produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito. Em certas modalidades, as células são classificadas para separar células $CD94^+$ e $CD94^-$. Em modalidades específicas, as células $CD94^+$ são isoladas. Em certas modalidades, as células são enriquecidas para células $CD94^+$ em comparação com o total de

células produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito. Em modalidades específicas, as células $CD94^{-}$ são isoladas. Em certas modalidades, as células são enriquecidas para células CD94- em comparação com o total de células produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito. Em certas modalidades, o isolamento é realizado usando separação magnética. Em certas modalidades, o isolamento é realizado usando citometria de fluxo.

[0355] Os métodos de isolamento de células ILC3 são conhecidos na técnica e podem ser usados para isolar as células ILC3, *por exemplo*, células ILC3 produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito. Por exemplo, as células ILC3 podem ser isoladas ou enriquecidas, por exemplo, pela coloração de células, em uma modalidade, com anticorpos para CD56 e CD3 e CD11a, e seleção para células $CD56^{+}CD3^{-}CD11a^{-}$. As células ILC3, *por exemplo*, células produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito, também podem ser isoladas ou enriquecidas pela remoção de células que não sejam células ILC3 em uma população de células que compreendem as células ILC3, *por exemplo*, células produzidas usando os três métodos de estágio, aqui descrito. Por exemplo, células ILC3, *por exemplo*, células produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito, podem ser isoladas ou enriquecidas por depleção de células que exibem marcadores de células não ILC3 usando, *por exemplo*, anticorpos para um ou mais de CD3, CD4, CD11a, CD14, CD19, CD20, CD36, CD66b, CD94, CD123, HLA DR e/ou CD235a (glicoforina A). As células isoladas por esses métodos podem ser classificadas adicionalmente, *por exemplo*, para separar células $CD117^{+}$ e $CD117^{-}$. As células NK podem ser isoladas ou enriquecidas, por exemplo, pela coloração de células, em uma modalidade, com anticorpos para CD56, CD3, CD94 e CD11a, e seleção de células $CD56^{+}CD3^{-}$ $CD94^{+}CD11a^{+}$. As células NK, *por exemplo*, células produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito, também podem ser isoladas ou enriquecidas pela

remoção de células que não sejam células NK em uma população de células que compreendem as células NK, *por exemplo*, células produzidas usando os três métodos de estágio, aqui descrito. Em certas modalidades, as células NK são enriquecidas para células $CD56^{+}CD3^{-}CD94^{+}CD11a^{+}$ em comparação com o total de células produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito.

[0356] Em uma modalidade, as células ILC3 são isoladas ou enriquecidas pela seleção de células $CD56^{+}CD3^{-}CD11a^{-}$. Em certas modalidades, as células ILC3 são enriquecidas para células $CD56^{+}CD3^{-}CD11a^{-}$ comparação com o total de células produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito. Em uma modalidade, as células ILC3 são isoladas ou enriquecidas selecionando células $CD56^{+}CD3^{-}CD11a^{-}CD117+$. Em certas modalidades, as células ILC3 são enriquecidas para células $CD56^{+}CD3^{-}CD11a^{-}CD117+$ comparação com o total de células produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito. Em uma modalidade, as células ILC3 são isoladas ou enriquecidas pela seleção de células $CD56^{+}CD3^{-}CD11a^{-}CD117^{+}CDIL1R1^{+}$. Em certas modalidades, as células ILC3 são enriquecidas para células $CD56^{+}CD3^{-}CD11a^{-}CD117^{+}CDIL1R1^{+}$ em comparação com o total de células produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito.

[0357] Em uma modalidade, as células NK são isoladas ou enriquecidas pela seleção de células $CD56^{+}CD3^{-}CD94^{+}CD11a^{+}$. Em certas modalidades, as células NK são enriquecidas para células $CD56^{+}CD3^{-}CD94^{+}CD11a^{+}$ comparação com o total de células produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito. Em uma modalidade, as células NK são isoladas ou enriquecidas selecionando células $CD56^{+}CD3^{-}CD94^{+}CD11a^{+}CD117^{-}$. Em certas modalidades, as células NK são enriquecidas para células $CD56^{+}CD3^{-}CD94^{+}CD11a^{+}CD117^{-}$ em comparação com o total de células produzidas usando o método de três estágios, aqui descrito.

[0358] A separação de células pode ser realizada, por *exemplo*, por citometria de fluxo, seleção de células ativadas por fluorescência (FACS) ou, em uma modalidade, seleção de células magnéticas usando microesferas conjugadas com anticorpos específicos. As células podem ser isoladas, *por exemplo*, usando uma técnica de classificação magnética ativada (MACS), um método para separar partículas com base em sua capacidade de ligar esferas magnéticas (*por exemplo*, cerca de 0,5-100 µm de diâmetro) que compreendem um ou mais anticorpos específicos *por exemplo*, anticorpos anti-CD56. A separação magnética de células pode ser realizada e automatizada usando, *por exemplo*, um Separador AUTOMACS™ (Miltenyi). Uma variedade de modificações úteis pode ser realizada nas microesferas magnéticas, incluindo a adição covalente de anticorpo que reconhece especificamente uma molécula de superfície celular particular ou hapteno. As esferas são então misturadas com as células para permitir a ligação. As células são então passadas através de um campo magnético para separar as células que possuem o marcador de superfície celular específico. Em uma modalidade, essas células podem então ser isoladas e misturadas novamente com esferas magnéticas acopladas a um anticorpo contra marcadores de superfície celular adicionais. As células são novamente passadas por um campo magnético, isolando as células que ligam os dois anticorpos. Essas células podem então ser diluídas em placas separadas, como placas de microtitulação para isolamento clonal.

5.5. Perfusato Placentário

[0359] As células NK e/ou células ILC3, *por exemplo*, populações de células NK e/ou células ILC3 produzidas de acordo com o método de três estágios aqui descrito podem ser produzidas a partir de células hematopoiéticas, *por exemplo*, tronco hematopoiético ou progenitores de qualquer fonte, *por exemplo*, tecido placentário, perfusato placentário, sangue do cordão umbilical, sangue

placentário, sangue periférico, baço, fígado ou semelhantes. Em certas modalidades, as células-tronco hematopoiéticas são células-tronco hematopoiéticas combinadas do perfusato placentário e do sangue do cordão umbilical da mesma placenta usada para gerar o perfusato placentário. Perfusato placentário compreendendo células de perfusato placentário que podem ser obtidas, por exemplo, pelos métodos divulgados nas Patentes U.S. Nos. 7.045.148 e 7.468.276 e na Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 2009/0104164, cujas divulgações estão aqui incorporadas em sua totalidade.

5.5.1. Composição de Coleta de Células

[0360] O perfusato e as células de perfusato placentário, a partir das quais o tronco hematopoiético ou progenitores podem ser isolados, ou úteis na supressão de tumor ou no tratamento de um indivíduo com células tumorais, câncer ou infecção viral, *por exemplo*, em combinação com as células NK e/ou ILC3 células, *por exemplo*, populações de células NK e/ou células ILC3 produzidas de acordo com o método de três estágios aqui fornecido, podem ser coletadas por perfusão de um mamífero, *por exemplo*, placenta humana pós-parto usando uma composição de coleta de células da placenta. O perfusato pode ser coletado da placenta por perfusão placentária com qualquer solução fisiologicamente aceitável, *por exemplo*, uma solução salina, meio de cultura ou uma composição de coleta de células mais complexa. Uma composição de coleta de células adequada para a perfusão de uma placenta e para a coleta e preservação de células de perfusão é descrita em detalhes na Publicação do Pedido U.S. 2007/0190042 relacionada, que está aqui incorporada por referência em sua totalidade.

[0361] A composição de coleta de células pode compreender qualquer solução fisiologicamente aceitável adequada para a coleta e/ou cultura de células-tronco, por exemplo, uma solução salina (*por exemplo*, solução salina

tamponada com fosfato, solução de Kreb, solução de Kreb modificada, solução de Eagle, NaCl a 0,9%. *etc*.), um meio de cultura (*por exemplo*, DMEM, H.DMEM, *etc*.) e semelhantes.

[0362] A composição de coleta de células pode compreender um ou mais componentes que tendem a preservar as células da placenta, ou seja, evitar que as células da placenta morram, ou retardar a morte das células da placenta, reduzir o número de células da placenta em uma população de células que morrem, ou semelhantes, desde o momento da coleta até o momento da cultura. Tais componentes podem ser, *por exemplo*, um inibidor de apoptose (*por exemplo*, um inibidor de caspase ou inibidor de JNK); um vasodilatador (*por exemplo*, sulfato de magnésio, um medicamento anti-hipertensivo, peptídeo natriurético atrial (ANP), adrenocorticotropina, hormônio liberador de corticotropina, nitroprussiato de sódio, hidralazina, trifosfato de adenosina, adenosina, indometacina ou sulfato de magnésio, um inibidor de fosfodiesterase *etc*); um inibidor de necrose (*por exemplo*, 2- (1H-Indol-3-il) -3-pentilamino-maleimida, ditiocarbamato de pirrolidina ou clonazepam); um inibidor de TNF-α; e/ou um perfluorocarbono que transporta oxigênio (*por exemplo*, brometo de perfluoro-octila, brometo de perfluorodecila, *etc*.).

[0363] A composição de coleta de células pode compreender uma ou mais enzimas de degradação de tecidos, *por exemplo*, uma metaloprotease, uma serina protease, uma protease neutra, uma hialuronidase, uma RNase ou uma DNase ou semelhantes. Essas enzimas incluem, mas não estão limitadas a, colagenases (*por exemplo*, colagenase I, II, III ou IV, uma colagenase de *Clostridium histolyticum*, *etc*.); dispase, termolisina, elastase, tripsina, LIBERASE, hialuronidase e semelhantes.

[0364] A composição de coleta de células pode compreender uma quantidade bacteriocida ou bacteriostaticamente eficaz de um antibiótico. Em

certas modalidades não limitativas, o antibiótico é um macrolídeo (*por exemplo*, tobramicina), uma cefalosporina (*por exemplo*, cefalexina, cefradina, cefuroxima, cefprozil, cefaclor, cefixima ou cefadroxil), uma claritromicina, uma eritromicina, uma penicilina (*por exemplo*, penicilina V) ou uma quinolona (*por exemplo*, ofloxacina, ciprofloxacina ou norfloxacina), uma tetraciclina, uma estreptomicina, *etc*. Em uma modalidade particular, o antibiótico é ativo contra bactérias Gram (+) e/ou Gram (-), *por exemplo*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e semelhantes.

[0365] A composição de coleta de células também pode compreender um ou mais dos seguintes compostos: adenosina (cerca de 1 mM a cerca de 50 mM); D-glucose (cerca de 20 mM a cerca de 100 mM); iões magnésio (cerca de 1 mM a cerca de 50 mM); uma macromolécula de peso molecular superior a 20.000 daltons, em uma modalidade, presente em uma quantidade suficiente para manter a integridade endotelial e a viabilidade celular (*por exemplo*, um colóide sintético ou natural, um polissacarídeo como dextrano ou um polietilenoglicol presente em cerca de 25 g/L a cerca de 100 g/L, ou cerca de 40 g/L a cerca de 60 g/L); um antioxidante (*por exemplo*, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, glutationa, vitamina C ou vitamina E presente em cerca de 25 µM a cerca de 100 µM); um agente redutor (*por exemplo*, N-acetilcisteína presente em cerca de 0,1 mM a cerca de 5 mM); um agente que impede a entrada de cálcio nas células (*por exemplo*, verapamil presente em cerca de 2 µM a cerca de 25 µM); nitroglicerina (*por exemplo*, cerca de 0,05 g/L a cerca de 0,2 g/L); um anticoagulante, em uma modalidade, presente em uma quantidade suficiente para ajudar a prevenir a coagulação do sangue residual (*por exemplo*, heparina ou hirudina presente em uma concentração de cerca de 1000 unidades/La cerca de 100.000 unidades/L); ou um composto contendo amilorida (*por exemplo*, amilorida, etil isopropil amilorida, hexametileno amilorida, dimetil amilorida ou

isobutil amilorida presente em cerca de 1,0 µM a cerca de 5 M).

5.5.2. Coleta e Manuseio da Placenta

[0366] Geralmente, a placenta humana é recuperada logo após sua expulsão após o nascimento. Em uma modalidade, a placenta é recuperada de um paciente após consentimento informado e após um histórico médico completo do paciente ser obtido e associado à placenta. Em uma modalidade, o histórico médico continua após o parto.

[0367] Antes da recuperação do perfusato, o sangue do cordão umbilical e o sangue da placenta são removidos. Em certas modalidades, após o parto, o sangue do cordão umbilical na placenta é recuperado. A placenta pode ser submetida a um processo convencional de recuperação do sangue do cordão umbilical. Tipicamente, uma agulha ou cânula é usada, com o auxílio da gravidade, para sangrar a placenta (*ver*, *por exemplo*, Anderson, Patente US No. 5.372.581; Hessel *et al.*, Patente U.S. No. 5.415.665). A agulha ou cânula é geralmente colocada na veia umbilical e a placenta pode ser massageada suavemente para ajudar na drenagem do sangue do cordão da placenta. Essa recuperação do sangue do cordão pode ser realizada comercialmente, *por exemplo*, LifeBank Inc., Cedar Knolls, N.J., ViaCord, Cord Blood Registry e CryoCell. Em uma modalidade, a placenta é drenada por gravidade sem manipulação adicional de modo a minimizar a ruptura do tecido durante a recuperação do sangue do cordão umbilical.

[0368] Normalmente, a placenta é transportada da sala de parto ou parto para outro local, *por exemplo*, um laboratório, para recuperação do sangue do cordão umbilical e coleta do perfusato. A placenta pode ser transportada em um dispositivo de transporte estéril e termicamente isolado (mantendo a temperatura da placenta entre 20-28 °C), por exemplo, colocando a placenta, com cordão umbilical proximal preso, em um saco plástico zip-lock estéril, que é

então colocado em um recipiente isolado. Em outra modalidade, a placenta é transportada em um kit de coleta de sangue do cordão substancialmente como descrito na Patente U.S. 7.147.626. Em uma modalidade, a placenta é entregue ao laboratório quatro a vinte e quatro horas após o parto. Em certas modalidades, o cordão umbilical proximal é preso, por exemplo, dentro de 4-5 cm (centímetro) da inserção no disco da placenta antes da recuperação do sangue do cordão. Em outras modalidades, o cordão umbilical proximal é pinçado após a recuperação do sangue do cordão, mas antes do processamento adicional da placenta.

[0369] A placenta, antes da coleta do perfusato, pode ser armazenada em condições estéreis e em temperatura ambiente ou de 5 a 25 °C (centígrados). A placenta pode ser armazenada por um período de mais de quarenta e oito horas, ou por um período de quatro a vinte e quatro horas antes da perfusão da placenta para remover qualquer sangue residual do cordão umbilical. A placenta pode ser armazenada em uma solução anticoagulante a uma temperatura de 5 °C a 25 °C (centígrados). As soluções anticoagulantes adequadas são bem conhecidas na técnica. Por exemplo, uma solução de heparina ou varfarina sódica pode ser usada. Em uma modalidade, a solução anticoagulante compreende uma solução de heparina (*por exemplo*, 1% p/p em solução 1:1000). Em algumas modalidades, a placenta sem sangue é armazenada por não mais do que 36 horas antes que o perfusato placentário seja coletado.

5.5.3. Perfusão Placentária

[0370] Métodos de perfusão placentária de mamíferos e obtenção de perfusato placentário são divulgados, *por exemplo*, em Hariri, Patentes U.S. Nos. 7.045.148 e 7.255.879, e na Publicação de Pedido U.S. Nos. 2009/0104164, 2007/0190042 e 20070275362, emitida como Patente U.S. No. 8.057.788, cujas divulgações estão aqui incorporadas por referência em sua totalidade.

[0371] O perfusato pode ser obtido pela passagem da solução de perfusão, *por exemplo*, solução salina, meio de cultura ou composições de coleta de células descritas acima, através da vasculatura placentária. Em uma modalidade, uma placenta de mamífero é perfundida pela passagem de solução de perfusão através de uma ou ambas da artéria umbilical e veia umbilical. O fluxo da solução de perfusão através da placenta pode ser realizado usando, *por exemplo*, fluxo de gravidade na placenta. Por exemplo, a solução de perfusão é forçada através da placenta usando uma bomba, *por exemplo*, uma bomba peristáltica. A veia umbilical pode ser, *por exemplo*, canulada com uma cânula, *por exemplo*, um TEFLON® ou cânula de plástico, que é conectada a um aparelho de conexão estéril, como um tubo estéril. O aparelho de conexão estéril é conectado a um coletor de perfusão.

[0372] Na preparação para a perfusão, a placenta pode ser orientada de forma que a artéria umbilical e a veia umbilical estejam localizadas no ponto mais alto da placenta. A placenta pode ser perfundida pela passagem de uma solução de perfusão através da vasculatura placentária ou através da vasculatura placentária e do tecido circundante. Em uma modalidade, a artéria umbilical e a veia umbilical são conectadas simultaneamente a uma pipeta que é conectada por meio de um conector flexível a um reservatório da solução de perfusão. A solução de perfusão é passada para a veia e artéria umbilical. A solução de perfusão exala e/ou atravessa as paredes dos vasos sanguíneos para os tecidos circundantes da placenta e é coletada em um vaso aberto adequado da superfície da placenta que foi anexada ao útero da mãe durante a gestação. A solução de perfusão também pode ser introduzida através da abertura do cordão umbilical e pode fluir ou filtrar para fora das aberturas na parede da placenta que fazem interface com a parede uterina materna. Em outra modalidade, a solução de perfusão é passada através das veias umbilicais e coletada da artéria

umbilical, ou é passada através da artéria umbilical e coletada das veias umbilicais, isto é, é passada apenas através da vasculatura placentária (tecido fetal).

[0373] Em uma modalidade, por exemplo, a artéria umbilical e a veia umbilical são conectadas simultaneamente *por exemplo*, a uma pipeta que é conectada a um conector flexível a um reservatório da solução de perfusão. A solução de perfusão é passada para a veia e artéria umbilical. A solução de perfusão exala e/ou atravessa as paredes dos vasos sanguíneos para os tecidos circundantes da placenta e é coletada em um vaso aberto adequado da superfície da placenta que foi anexada ao útero da mãe durante a gestação. A solução de perfusão também pode ser introduzida através da abertura do cordão umbilical e pode fluir ou filtrar para fora das aberturas na parede da placenta que fazem interface com a parede uterina materna. As células da placenta que são coletadas por este método, que pode ser referido como um método de "panela", são normalmente uma mistura de células fetais e maternas.

[0374] Em outra modalidade, a solução de perfusão é passada através das veias umbilicais e coletada da artéria umbilical, ou é passada através da artéria umbilical e coletada das veias umbilicais. As células da placenta coletadas por este método, que pode ser referido como um método de “circuito fechado”, são quase exclusivamente fetais.

[0375] O método de perfusão em circuito fechado pode, em uma modalidade, ser realizado como segue. A placenta pós-parto é obtida cerca de 48 horas após o nascimento. O cordão umbilical é pinçado e cortado acima da pinça. O cordão umbilical pode ser descartado ou pode ser processado para recuperar, *por exemplo*, células-tronco do cordão umbilical e/ou processar a membrana do cordão umbilical para a produção de um biomaterial. A membrana amniótica pode ser retida durante a perfusão ou pode ser separada do córion,

por exemplo, usando uma dissecção romba com os dedos. Se a membrana amniótica for separada do córion antes da perfusão, ela pode ser, *por exemplo*, descartada ou processada, *por exemplo*, para obter células-tronco por digestão enzimática, ou para produzir, *por exemplo*, um biomaterial de membrana amniótica, *por exemplo*, o biomaterial descrito na Publicação do Pedido U.S. No. 2004/0048796. Depois de limpar a placenta de todos os coágulos sanguíneos visíveis e sangue residual, *por exemplo*, usando gaze estéril, os vasos do cordão umbilical são expostos, *por exemplo*, cortando parcialmente a membrana do cordão umbilical para expor um corte transversal do cordão. Os vasos são identificados e abertos, *por exemplo*, avançando uma garra jacaré fechada através da extremidade cortada de cada vaso. O aparelho, *por exemplo*, um tubo de plástico conectado a um dispositivo de perfusão ou bomba peristáltica, é então inserido em cada uma das artérias placentárias. A bomba pode ser qualquer bomba adequada para o propósito, *por exemplo*, uma bomba peristáltica. Um tubo de plástico, conectado a um reservatório de coleta estéril, *por exemplo*, uma bolsa de sangue, como uma bolsa de coleta de 250 mL, é então inserido na veia placentária. Alternativamente, o tubo conectado à bomba é inserido na veia placentária e os tubos para reservatório(s) de coleta são inseridos em uma ou em ambas as artérias placentárias. A placenta é então perfundida com um volume de solução de perfusão, *por exemplo*, cerca de 750 ml de solução de perfusão. As células no perfusato são então coletadas, *por exemplo*, por centrifugação.

[0376] Em uma modalidade, o cordão umbilical proximal é preso durante a perfusão e, mais especificamente, pode ser preso dentro de 4-5 cm (centímetro) da inserção do cordão no disco da placenta.

[0377] A primeira coleta de fluido de perfusão de uma placenta de mamífero durante o processo de exsanguinação é geralmente colorida com

glóbulos vermelhos residuais do cordão umbilical e/ou sangue da placenta. O fluido de perfusão torna-se mais incolor à medida que a perfusão prossegue e as células do cordão umbilical residuais são eliminadas da placenta. Geralmente, de 30 a 100 mL de fluido de perfusão são adequados para limpar inicialmente o sangue da placenta, mas mais ou menos fluido de perfusão pode ser usado dependendo dos resultados observados.

[0378] Em certas modalidades, o sangue do cordão umbilical é removido da placenta antes da perfusão (*por exemplo*, por drenagem por gravidade), mas a placenta não é lavada (*por exemplo*, perfundida) com solução para remover o sangue residual. Em certas modalidades, o sangue do cordão umbilical é removido da placenta antes da perfusão (*por exemplo*, por drenagem por gravidade), e a placenta é lavada (*por exemplo*, perfundida) com solução para remover o sangue residual.

[0379] O volume de líquido de perfusão usado para perfundir a placenta pode variar dependendo do número de células placentárias a serem coletadas, do tamanho da placenta, do número de coletas a serem feitas de uma única placenta, *etc*. Em várias modalidades, o volume de líquido de perfusão pode ser de 50 mL a 5.000 mL, 50 mL a 4.000 mL, 50 mL a 3.000 mL, 100 mL a 2.000 mL, 250 mL a 2.000 mL, 500 mL a 2.000 mL ou 750 mL a 2.000 mL. Normalmente, a placenta é perfundida com 700-800 mL de líquido de perfusão após a exsanguinação.

[0380] A placenta pode ser perfundida várias vezes ao longo de várias horas ou vários dias. Quando a placenta deve ser perfundida uma pluralidade de vezes, ela pode ser mantida ou cultivada sob condições assépticas em um recipiente ou outro recipiente adequado e perfundida com uma composição de coleta de células ou uma solução de perfusão padrão (*por exemplo*, uma solução salina normal tal como solução salina tamponada com fosfato ("PBS") com ou sem um

anticoagulante (*por exemplo,* heparina, varfarina sódica, cumarina, bishidroxicumarina) e/ou com ou sem um agente antimicrobiano (*por exemplo*, β-mercaptoetanol (0,1 mM); antibióticos como estreptomicina (*por exemplo,* a 40-100 μg/ml), penicilina (*por exemplo,* a 40 U/ml), anfotericina B (*por exemplo*, a 0,5 μg/ml). Em uma modalidade, uma placenta isolada é mantida ou cultivada por um período de tempo sem coletar o perfusato, de modo que a placenta seja mantida ou cultivada por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24 horas, ou 2 ou 3 ou mais dias antes da perfusão e coleta do perfusato. A placenta perfundida pode ser mantida por um ou mais tempos adicionais, *por exemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou mais horas, e perfundido uma segunda vez com, *por exemplo*, 700-800 mL de fluido de perfusão. A placenta pode ser perfundida 1, 2, 3, 4, 5 ou mais vezes, por exemplo, uma vez a cada 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 horas. Em uma modalidade, a perfusão da placenta e a coleta da solução de perfusão, *por exemplo*, a composição de coleta de células da placenta, são repetidas até que o número de células nucleadas recuperadas caia abaixo de 100 células/ml. Os perfusatos em diferentes pontos de tempo podem ser posteriormente processados individualmente para recuperar populações de células dependentes do tempo, *por exemplo*, células nucleadas totais. Perfusados de diferentes pontos de tempo também podem ser agrupados.

5.5.4. Perfusado Placentário e Células de Perfusato Placentário

[0381] Normalmente, o perfusato placentário de uma única perfusão placentária compreende cerca de 100 milhões a cerca de 500 milhões de células nucleadas, incluindo células hematopoiéticas das quais células NK e/ou células ILC3, *por exemplo*, células NK e/ou células ILC3 produzidas de acordo com o método de três estágios aqui descrito, pode ser produzido pelo método aqui divulgado. Em certas modalidades, as células do perfusato ou perfusato da

placenta compreendem células $CD34^+$, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras. Essas células podem, em uma modalidade mais específica, compreender células-tronco ou progenitoras $CD34^+CD45^-$, células-tronco ou progenitoras $CD34^+CD45^+$ ou semelhantes. Em certas modalidades, as células do perfusato ou o perfusato são criopreservadas antes do isolamento das células hematopoiéticas delas. Em certas outras modalidades, o perfusato placentário compreende, ou as células do perfusato compreendem, apenas células fetais ou uma combinação de células fetais e células maternas.

5.6. Células NK

5.6.1. Células NK Produzidas pelo Método de Três Estágios

[0382] Em outra modalidade, é fornecida aqui uma população de células NK isoladas, em que as referidas células NK são produzidas de acordo com o método de três estágios descrito anteriormente.

[0383] Em uma modalidade, é fornecida aqui uma população de células NK isolada produzida por um método de três estágios aqui descrito, em que a referida população de células NK compreende uma porcentagem maior de células CD3-CD56 + do que uma população de células progenitoras NK produzida por um método de três estágios descrito aqui, *por exemplo*, uma população de células progenitoras NK produzida pelo mesmo método de três estágios, com a exceção de que a terceira etapa de cultura usada para produzir a população de células progenitoras NK foi de duração mais curta do que a terceira etapa de cultura usada para produzir a população de células NK. Em uma modalidade específica, a referida população de células NK compreende cerca de 70% ou mais, em algumas modalidades, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99% de células CD3 – CD56 +. Em outra modalidade específica, a referida população de células NK compreende não menos que 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99% de

células CD3-CD56 +. Em outra modalidade específica, a referida população de células NK compreende entre 70% -75%, 75% -80%, 80% -85%, 85% -90%, 90% -95% ou 95% -99% de células CD3– CD56+.

[0384] Em certas modalidades, as referidas células $CD3^{-}CD56^{+}$ na referida população de células NK compreendem células $CD3^{-}CD56^{+}$ que são adicionalmente $NKp46^{+}$. Em certas modalidades, as referidas células $CD3^{-}CD56^{+}$ na referida população de células NK compreendem células $CD3^{-}CD56^{+}$ que são adicionalmente CD16-. Em certas modalidades, as referidas células $CD3^{-}CD56^{+}$ na referida população de células NK compreendem células $CD3^{-}CD56^{+}$ que são adicionalmente CD16+. Em certas modalidades, as referidas células $CD3^{-}CD56^{+}$ na referida população de células NK compreendem células $CD3^{-}CD56^{+}$ que são adicionalmente CD94-. Em certas modalidades, as referidas células $CD3^{-}CD56^{+}$ na referida população de células NK compreendem células $CD3^{-}CD56^{+}$ que são adicionalmente CD94+. Em certas modalidades, as referidas células $CD3^{-}CD56^{+}$ na referida população de células NK compreendem células $CD3^{-}CD56^{+}$ que são adicionalmente $CD11a^{+}$. Em certas modalidades, as referidas células $CD3^{-}CD56^{+}$ na referida população de células NK compreendem células $CD3^{-}CD56^{+}$ que são adicionalmente $NKp30^{+}$. Em certas modalidades, as referidas células $CD3^{-}CD56^{+}$ na referida população de células NK compreendem células $CD3^{-}CD56^{+}$ que são adicionalmente $CD161^{+}$. Em certas modalidades, as referidas células $CD3^{-}CD56^{+}$ na referida população de células NK compreendem células $CD3^{-}CD56^{+}$ que são adicionalmente DNAM-1^{+}. Em certas modalidades, as referidas células $CD3^{-}CD56^{+}$ na referida população de células NK compreendem células $CD3^{-}CD56^{+}$ que são adicionalmente T-bet^{+}.

[0385] Em uma modalidade, uma população de células NK produzida por um método de três estágios aqui descrito compreende células que são CD117 +. Em uma modalidade, uma população de células NK produzida por um método

de três estágios aqui descrito compreende células que são NKG2D +. Em uma modalidade, uma população de células NK produzida por um método de três estágios aqui descrito compreende células que são NKp44+. Em uma modalidade, uma população de células NK produzida por um método de três estágios aqui descrito compreende células que são CD244+. Em uma modalidade, uma população de células NK produzida por um método de três estágios aqui descrito compreende células que expressam perforina. Em uma modalidade, uma população de células NK produzida por um método de três estágios aqui descrito compreende células que expressam EOMES. Em uma modalidade, uma população de células NK produzida por um método de três estágios aqui descrito compreende células que expressam granzima B. Em uma modalidade, uma população de células NK produzida por um método de três estágios aqui descrito compreende células que secretam IFNγ, GM-CSF e/ou TNFα.

5.7. Células ILC3

5.7.1. Células ILC3 Produzidas pelo Método de Três Estágios

[0386] Em outra modalidade, é fornecida aqui uma população de células ILC3 isoladas, em que as referidas células ILC3 são produzidas de acordo com o método de três estágios descrito anteriormente.

[0387] Em uma modalidade, é fornecida aqui uma população de células ILC3 isolada produzida por um método de três estágios aqui descrito, em que a referida população de células ILC3 compreende uma porcentagem maior de células CD3-CD56 + do que uma população de células progenitoras ILC3 produzida por um método de três estágios descrito aqui, *por exemplo*, uma população de células progenitoras ILC3 produzida pelo mesmo método de três estágios, com a exceção de que a terceira etapa de cultura usada para produzir a população de células progenitoras ILC3 foi de duração mais curta do que a

terceira etapa de cultura usada para produzir a população de células ILC3. Em uma modalidade específica, a referida população de células ILC3 compreende cerca de 70% ou mais, em algumas modalidades, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99% de células CD3 – CD56 +. Em outra modalidade específica, a referida população de células ILC3 compreende não menos que 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99% de células CD3-CD56 +. Em outra modalidade específica, a referida população de células ILC3 compreende entre 70% -75%, 75% -80%, 80% -85%, 85% -90%, 90% -95% ou 95% -99% de células CD3–CD56+.

[0388] Em certas modalidades, as referidas células $CD3^{-}CD56^{+}$ na referida população de células ILC3 compreendem células $CD3^{-}CD56^{+}$ que são adicionalmente $NKp46^{-}$. Em certas modalidades, as referidas células $CD3^{-}CD56^{+}$ na referida população de células ILC3 compreendem células $CD3^{-}CD56^{+}$ que são adicionalmente CD16-. Em certas modalidades, as referidas células $CD3^{-}CD56^{+}$ na referida população de células ILC3 compreendem células $CD3^{-}CD56^{+}$ que são adicionalmente IL1R1+. Em certas modalidades, as referidas células $CD3^{-}CD56^{+}$ na referida população de células ILC3 compreendem células $CD3^{-}CD56^{+}$ que são adicionalmente CD94-. Em certas modalidades, as referidas células $CD3^{-}CD56^{+}$ na referida população de células ILC3 compreendem células $CD3^{-}CD56^{+}$ que são adicionalmente RORγt+. Em certas modalidades, as referidas células $CD3^{-}CD56^{+}$ na referida população de células ILC3 compreendem células $CD3^{-}CD56^{+}$ que são adicionalmente $CD11a^{-}$. Em certas modalidades, as referidas células $CD3^{-}CD56^{+}$ na referida população de células ILC3 compreendem células $CD3^{-}CD56^{+}$ que são adicionalmente T-bet+.

[0389] Em uma modalidade, uma população de células ILC3 produzida por um método de três estágios aqui descrito compreende células que são CD117+. Em uma modalidade, uma população de células ILC3 produzida por um método de três estágios aqui descrito compreende células que são $NKG2D^{-}$. Em uma

modalidade, uma população de células ILC3 produzida por um método de três estágios aqui descrito compreende células que são NKp30⁻. Em uma modalidade, uma população de células ILC3 produzida por um método de três estágios aqui descrito compreende células que são CD244+. Em uma modalidade, uma população de células ILC3 produzida por um método de três estágios aqui descrito compreende células que são DNAM-1+. Em uma modalidade, uma população de células ILC3 produzida por um método de três estágios aqui descrito compreende células que expressam AHR. Em uma modalidade, uma população de células ILC3 produzida por um método de três estágios aqui descrito compreende células que não expressam perforina. Em uma modalidade, uma população de células ILC3 produzida por um método de três estágios aqui descrito compreende células que não expressam EOMES. Em uma modalidade, uma população de células ILC3 produzida por um método de três estágios aqui descrito compreende células que não expressam granzima B. Em uma modalidade, uma população de células ILC3 produzida por um método de três estágios aqui descrito compreende células que secretam IL-22 e/ou IL-8.

[0390] Em certos aspectos, as populações de células produzidas pelo método de três estágios aqui descrito compreendem células CD11a + e células CD11a– em uma razão de 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 ou 1:50. Em certos aspectos, uma população de células aqui descrita compreende células CD11a + e células CD11a– em uma razão de 50:1. Em certos aspectos, uma população de células aqui descrita compreende células CD11a + e células CD11a– em uma razão de 20:1. Em certos aspectos, uma população de células aqui descrita compreende células CD11a + e células CD11a– em uma razão de 10:1. Em certos aspectos, uma população de células aqui descrita compreende células CD11a + e células CD11a– em uma razão de 5:1. Em certos aspectos, uma população de células aqui descrita

compreende células CD11a + e células CD11a– em uma razão de 1:1. Em certos aspectos, uma população de células aqui descrita compreende células CD11a + e células CD11a– em uma razão de 1:5. Em certos aspectos, uma população de células aqui descrita compreende células CD11a + e células CD11a– em uma razão de 1:10. Em certos aspectos, uma população de células aqui descrita compreende células CD11a + e células CD11a– em uma razão de 1:20. Em certos aspectos, uma população de células aqui descrita compreende células CD11a + e células CD11a– em uma razão de 1:50.

[0391] Em certos aspectos, as populações de células aqui descritas são produzidas combinando as células CD11a + com as células CD11a– em uma razão de 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 ou 1:50 para produzir uma população combinada de células. Em certos aspectos, uma população de células combinada aqui descrita compreende células CD11a + e células CD11a– combinadas em uma razão de 50:1. Em certos aspectos, uma população de células combinadas aqui descrita compreende células CD11a + e células CD11a– combinadas em uma razão de 20:1. Em certos aspectos, uma população de células combinadas aqui descrita compreende células CD11a + e células CD11a– combinadas em uma razão de 10:1. Em certos aspectos, uma população de células combinadas aqui descrita compreende células CD11a + e células CD11a– combinadas em uma razão de 5:1. Em certos aspectos, uma população de células combinadas aqui descrita compreende células CD11a + e células CD11a– combinadas em uma razão de 1:1. Em certos aspectos, uma população de células combinadas aqui descrita compreende células CD11a + e células CD11a– combinadas em uma razão de 1:5. Em certos aspectos, uma população de células combinadas aqui descrita compreende células CD11a + e células CD11a– combinadas em uma razão de 1:10. Em certos aspectos, uma população de células combinadas aqui descrita compreende

células CD11a + e células CD11a– combinadas em uma razão de 1:20. Em certos aspectos, uma população de células combinadas aqui descrita compreende células CD11a + e células CD11a– combinadas em uma razão de 1:50.

[0392] Em certos aspectos, as populações de células produzidas pelo método de três estágios aqui descrito compreendem células NK e células ILC3 em uma razão de 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 ou 1:50. Em certos aspectos, uma população de células aqui descrita compreende células NK e células ILC3 em uma razão de 50:1. Em certos aspectos, uma população de células aqui descrita compreende células NK e células ILC3 em uma razão de 20:1. Em certos aspectos, uma população de células aqui descrita compreende células NK e células ILC3 em uma razão de 10:1. Em certos aspectos, uma população de células aqui descrita compreende células NK e células ILC3 em uma razão de 5:1. Em certos aspectos, uma população de células aqui descrita compreende células NK e células ILC3 em uma razão de 1:1. Em certos aspectos, uma população de células aqui descrita compreende células NK e células ILC3 em uma razão de 1:5. Em certos aspectos, uma população de células aqui descrita compreende células NK e células ILC3 em uma razão de 1:10. Em certos aspectos, uma população de células aqui descrita compreende células NK e células ILC3 em uma razão de 1:20. Em certos aspectos, uma população de células aqui descrita compreende células NK e células ILC3 em uma razão de 1:50.

[0393] Em certos aspectos, as populações de células aqui descritas são produzidas combinando as células NK com as células ILC3 em uma razão de 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 ou 1:50 para produzir uma população combinada de células. Em certos aspectos, uma população de células combinadas aqui descrita compreende células NK e células ILC3 combinadas em uma razão de 50:1. Em certos aspectos,

uma população de células combinadas aqui descrita compreende células NK e células ILC3 combinadas em uma razão de 20:1. Em certos aspectos, uma população de células combinadas aqui descrita compreende células NK e células ILC3 combinadas em uma razão de 10:1. Em certos aspectos, uma população de células combinadas aqui descrita compreende células NK e células ILC3 combinadas em uma razão de 5:1. Em certos aspectos, uma população de células combinadas aqui descrita compreende células NK e células ILC3 combinadas em uma razão de 1:1. Em certos aspectos, uma população de células combinadas aqui descrita compreende células NK e células ILC3 combinadas em uma razão de 1:5. Em certos aspectos, uma população de células combinadas aqui descrita compreende células NK e células ILC3 combinadas em uma razão de 1:10. Em certos aspectos, uma população de células combinadas aqui descrita compreende células NK e células ILC3 combinadas em uma razão de 1:20. Em certos aspectos, uma população de células combinadas aqui descrita compreende células NK e células ILC3 combinadas em uma razão de 1:50.

5.8. Células NK e/ou Células ILC3 em Combinação com Perfusato Placentário

[0394] Além disso, são fornecidas aqui composições compreendendo células NK e/ou células ILC3 de acordo com o método de três estágios aqui descrito, em combinação com perfusato placentário, células de perfusato placentário e/ou células placentárias aderentes, *por exemplo*, para uso na supressão da proliferação de um tumor célula ou pluralidade de células tumorais.

5.8.1. Combinações de células NK e/ou Células ILC3 e Perfusato ou Células de Perfusato

[0395] Além disso, são fornecidas neste documento composições que compreendem combinações de células NK e/ou populações de células ILC3

produzidas de acordo com o método de três estágios aqui descrito e células de perfusato placentário e/ou perfusato placentário. Em uma modalidade, por exemplo, é fornecido neste documento um volume de perfusato placentário suplementado com células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos descritos neste documento. Em modalidades específicas de um volume de perfusato placentário suplementado com células NK e células ILC3, as células NK e células ILC3 estão presentes em razões conforme descrito neste documento. Em modalidades específicas, por exemplo, cada mililitro de perfusato placentário é suplementado com cerca de 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8 ou mais células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos. Em outra modalidade, as células de perfusato placentário são suplementadas com células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos. Em certas outras modalidades, quando as células de perfusato placentário são combinadas com células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos, as células do perfusato da placenta geralmente compreendem cerca de, mais do que cerca ou menos do que cerca de 50%, 45%, 40 %, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% ou 1% do número total de células. Em certas outras modalidades, quando as células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos são combinadas com uma pluralidade de células de perfusato placentário e/ou células exterminadoras naturais combinadas, as populações de células NK e/ou células ILC3 ou células NK geralmente compreendem cerca, mais do que cerca ou menos do que cerca de 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% ou 1% do número total de células. Em certas outras modalidades, quando as células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos são usadas para suplementar o perfusato placentário, o volume de solução (*por exemplo*, solução salina, meio de cultura ou semelhante) em que as

células estão suspensas compreende cerca de , maior que cerca ou menor que cerca de 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% ou 1% do volume total do perfusato mais células, em que as células NK e/ou células ILC3 são suspensas a cerca de 1 x 10^4, 5 x 10^4, 1 x 10^5, 5 x 10^5, 1 x 10^6, 5 x 10^6, 1 x 10^7, 5 x 10^7, 1 x 10^8, 5 x 10^8 ou mais células por mililitro antes da suplementação.

[0396] Em outras modalidades, qualquer uma das combinações de células acima é, por sua vez, combinada com sangue do cordão umbilical ou células nucleadas do sangue do cordão umbilical.

[0397] Ainda fornecido aqui é perfusato placentário agrupado que é obtido de duas ou mais fontes, *por exemplo*, duas ou mais placentas, e combinado, *por exemplo*, agrupado. Tal perfusato agrupado pode compreender volumes aproximadamente iguais de perfusato de cada fonte, ou pode compreender volumes diferentes de cada fonte. Os volumes relativos de cada fonte podem ser selecionados aleatoriamente ou podem ser baseados em, *por exemplo*, uma concentração ou quantidade de um ou mais fatores celulares, *por exemplo*, citocinas, fatores de crescimento, hormônios ou semelhantes; o número de células da placenta no perfusato de cada fonte; ou outras características do perfusato de cada fonte. O perfusato de múltiplas perfusões da mesma placenta pode ser similarmente agrupado.

[0398] Da mesma forma, são fornecidas aqui células de perfusato placentário e células exterminadoras naturais intermediárias derivadas da placenta, que são obtidas de duas ou mais fontes, *por exemplo*, duas ou mais placentas, e agrupadas. Essas células agrupadas podem compreender números aproximadamente iguais de células de duas ou mais fontes, ou diferentes números de células de uma ou mais das fontes agrupadas. Os números relativos de células de cada fonte podem ser selecionados com base, *por exemplo*, no

número de um ou mais tipos de células específicos nas células a serem agrupadas, *por exemplo*, o número de células $CD34^+$, *etc*.

[0399] Além disso, são fornecidas aqui células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos, e combinações de tais células com células de perfusato placentário e/ou perfusato placentário, que foram testadas para determinar o grau ou quantidade de supressão tumoral (isto é, a potência) a ser esperada de, *por exemplo*, um determinado número de células NK e/ou células ILC3 ou células NK e/ou populações de células ILC3 ou um determinado volume de perfusato. Por exemplo, uma alíquota ou número de amostra de células é contatado ou colocado em proximidade com um número conhecido de células tumorais sob condições em que as células tumorais proliferariam, e a taxa de proliferação das células tumorais na presença de perfusato placentário, células de perfusato, células exterminadoras naturais da placenta, ou combinações das mesmas, ao longo do tempo (*por exemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 semanas, ou mais) é comparado com a proliferação de um equivalente número de células tumorais na ausência de perfusato, células perfusadas, células exterminadoras naturais da placenta ou combinações das mesmas. A potência das células pode ser expressa, *por exemplo*, como o número de células ou o volume de solução necessário para suprimir o crescimento de células tumorais, *por exemplo*, em cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% ou semelhantes.

[0400] Em certas modalidades, as células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos, são fornecidas como unidades administráveis de grau farmacêutico. Essas unidades podem ser fornecidas em volumes discretos, *por exemplo*, 15 mL, 20 mL, 25 mL, 30 nL. 35 mL, 40 mL, 45 mL, 50 mL, 55 mL, 60 mL, 65 mL, 70 mL, 75 mL, 80 mL, 85 mL, 90 mL, 95 mL, 100 mL, 150 mL, 200 mL, 250 mL, 300 mL, 350 mL, 400 mL, 450 mL, 500 mL ou semelhantes.

Essas unidades podem ser fornecidas de modo a conter um número especificado de células, *por exemplo*, células NK e/ou células ILC3 ou populações de células NK e/ou células ILC3 em combinação com outras células NK e/ou células ILC3 ou células de perfusato, *por exemplo*, 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8 ou mais células por mililitro, ou 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11} ou mais células por unidade. Em modalidades específicas, as unidades podem compreender cerca de, pelo menos cerca de, ou no máximo cerca de 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6 ou mais de células NK por mililitro, ou 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11} ou mais células por unidade. Essas unidades podem ser fornecidas para conter números especificados de células NK e/ou células ILC3 ou populações de células NK e/ou células ILC3 e/ou qualquer uma das outras células.

[0401] Nas modalidades acima, as células NK e/ou células ILC3 ou populações dec élulas NK e/ou células ILC3 ou combinações de células NK e/ou células ILC3 ou populações de células NK e/ou células ILC3 com outras células NK e/ou células ILC3, células de perfusato ou perfusato podem ser autólogas para um receptor (isto é, obtidas do receptor), ou alogênicas para um receptor (isto é, obtidas de pelo menos um outro indivíduo do referido receptor).

[0402] Em certas modalidades, cada unidade de células é marcada para especificar um ou mais de volume, número de células, tipo de células, se a unidade foi enriquecida para um determinado tipo de célula e/ou potência de um determinado número de células em a unidade, ou um determinado número de mililitros da unidade, isto é, se as células na unidade causam uma supressão mensurável da proliferação de um determinado tipo ou tipos de células tumorais.

5.8.2. Combinações de Células NK e/ou Células ILC3 com Células-tronco Placentárias Aderentes

[0403] Em outras modalidades, as células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos descritos neste documento, *por exemplo*, populações de células NK e/ou células ILC3 produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, sozinho ou em combinação com células de perfusato placentário ou perfusato placentário, são suplementados com células aderentes da placenta isoladas, *por exemplo*, células-tronco da placenta e células multipotentes da placenta, conforme descrito, *por exemplo*, nas Patentes Hariri U.S. Nos. 7.045.148 e 7.255.879, e na Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 2007/0275362, cujas divulgações estão incorporadas neste documento por referência em sua totalidade. Em modalidades específicas, as células NK e as células ILC3, as células NK e as células ILC3 estão presentes nas razões aqui descritas. “Células placentárias aderentes” significa que as células são aderentes a uma superfície de cultura de tecidos, *por exemplo*, plástico de cultura de tecidos. As células placentárias aderentes úteis nas composições e métodos aqui divulgados não são geralmente trofoblastos, células germinativas embrionárias ou células estaminais embrionárias.

[0404] As células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos descritos neste documento, *por exemplo*, populações de células NK e/ou células ILC3, sozinhas ou em combinação com células de perfusato placentário ou perfusato placentário podem ser suplementadas com, *por exemplo*, 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8 ou mais células placentárias aderentes por mililitro, ou 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11} ou mais células da placenta aderentes. As células placentárias aderentes nas combinações podem ser, *por exemplo*, células aderentes da placenta que foram

cultivadas para, *por exemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 ou 40 duplicações de população ou mais.

[0405] Células placentárias aderentes isoladas, quando cultivadas em culturas primárias ou expandidas em cultura de células, aderem ao substrato de cultura de tecidos, *por exemplo*, superfície do recipiente de cultura de tecidos (*por exemplo*, plástico de cultura de tecidos). As células placentárias aderentes em cultura assumem uma aparência geralmente fibroblastoide e estrelada, com vários processos citoplasmáticos que se estendem do corpo celular central. As células aderentes da placenta são, no entanto, morfologicamente distinguíveis dos fibroblastos cultivados nas mesmas condições, uma vez que as células aderentes da placenta exibem um número maior de tais processos do que os fibroblastos. Morfologicamente, as células placentárias aderentes também são distinguíveis das células-tronco hematopoiéticas, que geralmente assumem uma morfologia mais arredondada, ou paralelepípedo, em cultura.

[0406] As células placentárias aderentes isoladas e as populações de células placentárias aderentes, úteis nas composições e métodos aqui fornecidos, expressam uma pluralidade de marcadores que podem ser usados para identificar e/ou isolar as células, ou populações de células que compreendem as células placentárias aderentes. As células placentárias aderentes e as populações de células placentárias aderentes úteis nas composições e métodos aqui fornecidos incluem células placentárias aderentes e populações de células contendo células placentárias aderentes obtidas diretamente da placenta, ou qualquer parte delas (*por exemplo*, âmnio, córion, âmnio-córion placa, cotilédones placentários, cordão umbilical e semelhantes). A população de células-tronco placentárias aderentes, em uma modalidade, é uma população (isto é, duas ou mais) de células-tronco placentárias aderentes em cultura, *por exemplo*, uma população em um recipiente, *por exemplo*, um saco.

[0407] As células placentárias aderentes geralmente expressam os marcadores CD73, CD105 e CD200 e/ou OCT-4, e não expressam CD34, CD38 ou CD45. As células-tronco placentárias aderentes também podem expressar HLA-ABC (MHC-1) e HLA-DR. Esses marcadores podem ser usados para identificar células placentárias aderentes e para distinguir as células placentárias aderentes de outros tipos de células. Como as células placentárias aderentes podem expressar CD73 e CD105, elas podem ter características semelhantes às células-tronco mesenquimais. A falta de expressão de CD34, CD38 e/ou CD45 identifica as células-tronco placentárias aderentes como células-tronco não hematopoiéticas.

[0408] Em certas modalidades, as células placentárias aderentes isoladas aqui descritas suprimem de forma detectável a proliferação de células cancerosas ou o crescimento do tumor.

[0409] Em certas modalidades, as células placentárias aderentes isoladas são células-tronco placentárias isoladas. Em certas outras modalidades, as células placentárias aderentes isoladas são células multipotentes placentárias isoladas. Em uma modalidade específica, as células placentárias aderentes isoladas são $CD34^{-}$, $CD10^{+}$ e $CD105^{+}$ conforme detectado por citometria de fluxo. Em uma modalidade mais específica, as células placentárias aderentes isoladas $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ são células-tronco placentárias. Em outra modalidade mais específica, as células placentárias isoladas $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ são células placentárias aderentes multipotentes. Em outra modalidade específica, as células placentárias isoladas $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ têm o potencial de se diferenciar em células de um fenótipo neural, células de um fenótipo osteogênico ou células de um fenótipo condrogênico. Em uma modalidade mais específica, as células placentárias aderentes isoladas $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ são adicionalmente $CD200^{+}$. Em outra modalidade mais específica, as células

placentárias aderentes isoladas $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ são adicionalmente $CD90^+$ ou $CD45^-$, conforme detectado por citometria de fluxo. Em outra modalidade mais específica, as células placentárias aderentes isoladas $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ são adicionalmente $CD90^+$ ou $CD45^-$, conforme detectado por citometria de fluxo. Em uma modalidade mais específica, as células placentárias aderentes $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ são adicionalmente $CD90^+$ ou $CD45^-$, conforme detectado por citometria de fluxo. Em outra modalidade mais específica, as células placentárias aderentes $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ são adicionalmente $CD90^+$ e $CD45^-$, conforme detectado por citometria de fluxo. Em outra modalidade mais específica, as células placentárias aderentes $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD90^+$, $CD45^-$ são adicionalmente CD80– e $CD86^-$, conforme detectado por citometria de fluxo.

[0410] Em uma modalidade, as células placentárias aderentes isoladas são $CD200^+$, HLA-G^+. Em uma modalidade específica, as referidas células placentárias aderentes isoladas também são $CD73^+$ e $CD105^+$. Em outra modalidade específica, as referidas células placentárias aderentes isoladas também são $CD34^-$, $CD38^-$ ou $CD45^-$. Em uma modalidade mais específica, as referidas células placentárias aderentes isoladas também são $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$ e $CD105^+$. Em outra modalidade, as referidas células placentárias aderentes isoladas produzem um ou mais corpos semelhantes a embrioides quando cultivadas em condições que permitem a formação de corpos semelhantes a embrioides.

[0411] Em outra modalidade, as células placentárias aderentes isoladas são $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$. Em uma modalidade específica das referidas populações, as referidas células placentárias aderentes isoladas também são HLA-G^+. Em outra modalidade específica, as referidas células placentárias aderentes isoladas também são $CD34^-$, $CD38^-$ ou $CD45^-$. Em outra modalidade

específica, as referidas células placentárias aderentes isoladas também são $CD34^-$, $CD38^-$ e $CD45^-$. Em uma modalidade mais específica, as referidas células aderentes da placenta isoladas também são $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, e $HLA\text{-}G^+$. Em outra modalidade específica, as referidas células placentárias aderentes isoladas produzem um ou mais corpos semelhantes a embrioides quando cultivadas em condições que permitem a formação de corpos semelhantes a embrioides.

[0412] Em outra modalidade, as células placentárias aderentes isoladas são $CD200^+$, $OCT\text{-}4^+$. Em uma modalidade específica, as referidas células placentárias aderentes isoladas também são $CD73^+$ e $CD105^+$. Em outra modalidade específica, as referidas células placentárias aderentes isoladas também são $HLA\text{-}G^+$. Em outra modalidade específica, as referidas células placentárias aderentes isoladas também são $CD34^-$, $CD38^-$ e $CD45^-$. Em uma modalidade mais específica, as referidas células aderentes da placenta isoladas também são $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$, $CD105^+$ e $HLA\text{-}G^+$. Em outra modalidade específica, as células placentárias aderentes isoladas também produzem um ou mais corpos semelhantes a embrioides quando cultivadas em condições que permitem a formação de corpos semelhantes a embrioides.

[0413] Em outra modalidade, as células placentárias aderentes isoladas são $CD73^+$, $CD105^+$ e $HLA\text{-}G^+$. Em uma modalidade específica, as referidas células placentárias aderentes isoladas também são $CD34^-$, $CD38^-$ ou $CD45^-$. Em outra modalidade específica, as referidas células placentárias aderentes isoladas são $CD34^-$, $CD38^-$ e $CD45^-$. Em outra modalidade específica, as referidas células-tronco aderentes também são $OCT\text{-}4^+$. Em outra modalidade específica, as referidas células-tronco aderentes também são $CD200^+$. Em uma modalidade mais específica, as referidas células-tronco aderentes também são $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $OCT\text{-}4^+$ e $CD200^+$.

[0414] Em outra modalidade, as células aderentes da placenta isoladas são

células-tronco $CD73^+$, $CD105^+$, em que as referidas células produzem um ou mais corpos semelhantes a embrióides sob condições que permitem a formação de corpos semelhantes a embrióides. Em uma modalidade específica, as referidas células placentárias aderentes isoladas também são $CD34^-$, $CD38^-$ ou $CD45^-$. Em outra modalidade específica, as células placentárias aderentes isoladas também são $CD34^-$, $CD38^-$ e $CD45^-$. Em outra modalidade específica, as células placentárias aderentes isoladas também são OCT-4^+. Em uma modalidade mais específica, as referidas células placentárias aderentes isoladas também são OCT-4^+, $CD34^-$, $CD38^-$ e $CD45^-$.

[0415] Em outra modalidade, as células-tronco placentárias aderentes são células-tronco OCT-4^+, em que as referidas células-tronco da placenta aderentes produzem um ou mais corpos semelhantes a embrioides quando cultivadas em condições que permitem a formação de corpos semelhantes a embrioides, e em que as referidas células-tronco foram identificadas como suprimindo de forma detectável a proliferação de células cancerosas ou o crescimento do tumor.

[0416] Em várias modalidades, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50% pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou pelo menos pelo menos 95% das referidas células placentárias aderentes isoladas são OCT-4^+. Em uma modalidade específica das populações anteriores, as referidas células placentárias aderentes isoladas também são $CD73^+$ e $CD105^+$. Em outra modalidade específica, as referidas células placentárias aderentes isoladas também são $CD34^-$, $CD38^-$, ou $CD45^-$. Em outra modalidade específica, as referidas células-tronco são $CD200^+$. Em uma modalidade mais específica, as referidas células placentárias aderentes isoladas também são $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$, $CD38^-$, e $CD45^-$. Em outra modalidade específica, as referidas células placentárias aderentes isoladas foram expandidas, por exemplo,

passadas pelo menos uma vez, pelo menos três vezes, pelo menos cinco vezes, pelo menos 10 vezes, pelo menos 15 vezes, ou pelo menos 20 vezes.

[0417] Em uma modalidade mais específica de qualquer uma das modalidades acima, as células placentárias aderentes isoladas expressam ABC-p (uma proteína transportadora ABC específica da placenta; *ver*, *por exemplo*, Allikmets *et al*., *Cancer Res.*58 (23): 5337-9 (1998)).

[0418] Em outra modalidade, as células placentárias aderentes isoladas $CD29^+$, $CD44^+$, $CD73^+$, $CD90^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$ e $CD133^-$. Em outra modalidade, as células placentárias aderentes isoladas secretam constitutivamente IL-6, IL-8 e proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1).

[0419] Cada uma das células placentárias aderentes isoladas referenciadas acima pode compreender células obtidas e isoladas diretamente de uma placenta de mamífero, ou células que foram cultivadas e passadas pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30 ou mais vezes, ou uma combinação das mesmas. Pluralidades supressoras de células tumorais das células placentárias aderentes isoladas descritas acima podem compreender cerca de, pelo menos, ou não mais do que, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11} ou mais células placentárias aderentes isoladas.

5.8.3. Composições Compreendendo Meios Condicionados de Células Placentárias Aderentes

[0420] Também é fornecido aqui o uso de uma composição compreendendo células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos, *por exemplo*, populações de células NK e/ou células ILC3 produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, e meio adicionalmente condicionado, em que a referida composição é supressora de tumor ou é eficaz no tratamento de câncer ou infecção viral. Em modalidades

específicas, as células NK e as células ILC3 estão presentes nas razões aqui descritas. As células placentárias aderentes, conforme descrito neste documento, podem ser usadas para produzir meio condicionado que é supressor de células tumorais, anticâncer ou antiviral, isto é, meio compreendendo uma ou mais biomoléculas secretadas ou excretadas pelas células que têm um efeito supressor de células tumorais detectáveis, efeito anticancerígeno ou efeito antiviral. Em várias modalidades, o meio condicionado compreende meio no qual as células proliferaram (isto é, foram cultivadas) por pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou mais dias. Em outras modalidades, o meio condicionado compreende meio em que tais células cresceram até pelo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% de confluência ou até 100% de confluência. Esse meio condicionado pode ser usado para suportar a cultura de uma população separada de células, *por exemplo*, células placentárias ou células de outro tipo. Em outra modalidade, o meio condicionado fornecido aqui compreende meio em que células placentárias aderentes isoladas, *por exemplo*, células-tronco placentárias aderentes isoladas ou células multipotentes placentárias aderentes isoladas, e células que não sejam células placentárias aderentes isoladas, *por exemplo*, células-tronco não placentárias ou células multipotentes, foram cultivadas.

[0421] Tal meio condicionado pode ser combinado com qualquer uma ou qualquer combinação de células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos, perfusato placentário ou células de perfusato placentário para formar uma composição que é supressora de células tumorais, anticâncer ou antiviral. Em certas modalidades, a composição compreende menos da metade do meio condicionado em volume, *por exemplo*, cerca ou menos que cerca de 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% ou 1% por volume.

[0422] Assim, em uma modalidade, é fornecida aqui uma composição compreendendo células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos descritos neste documento e meio de cultura de uma cultura de células placentárias aderentes isoladas, em que as referidas células placentárias aderentes isoladas (a) aderem a um substrato; e (b) são $CD34^{-}$, $CD10^{+}$ e $CD105^{+}$; em que a referida composição suprime de forma detectável o crescimento ou proliferação de células tumorais, ou é anticâncer ou antiviral. Em uma modalidade específica, as células placentárias aderentes isoladas são $CD34^{-}$, $CD10^{+}$ e $CD105^{+}$ conforme detectado por citometria de fluxo. Em uma modalidade mais específica, as células placentárias aderentes isoladas $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ são células-tronco placentárias. Em outra modalidade mais específica, as células placentárias isoladas $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ são células placentárias aderentes multipotentes. Em outra modalidade específica, as células placentárias isoladas $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ têm o potencial de se diferenciar em células de um fenótipo neural, células de um fenótipo osteogênico ou células de um fenótipo condrogênico. Em uma modalidade mais específica, as células placentárias aderentes isoladas $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ são adicionalmente $CD200^{+}$. Em outra modalidade mais específica, as células placentárias aderentes isoladas $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ são adicionalmente $CD90^{+}$ ou $CD45^{-}$, conforme detectado por citometria de fluxo. Em outra modalidade mais específica, as células placentárias aderentes isoladas $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ são adicionalmente $CD90^{+}$ ou $CD45^{-}$, conforme detectado por citometria de fluxo. Em uma modalidade mais específica, as células placentárias aderentes $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ são adicionalmente $CD90^{+}$ ou $CD45^{-}$, conforme detectado por citometria de fluxo. Em outra modalidade mais específica, as células placentárias aderentes $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ são adicionalmente $CD90^{+}$ e $CD45^{-}$, conforme detectado por citometria de fluxo. Em

outra modalidade mais específica, as células placentárias aderentes $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$, $CD90^{+}$, $CD45^{-}$ são adicionalmente $CD80^{-}$ e $CD86^{-}$, conforme detectado por citometria de fluxo.

[0423] Em outra modalidade, é fornecida aqui uma composição compreendendo células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos e meio de cultura de uma cultura de células placentárias aderentes isoladas, em que as referidas células placentárias aderentes isoladas (a) aderem a um substrato; e (b) expressar CD200 e HLA-G, ou expressar CD73, CD105 e CD200, ou expressar CD200 e OCT-4, ou expressar CD73, CD105 e HLA-G, ou expressar CD73 e CD105 e facilitar a formação de um ou mais corpos semelhantes a embrioides em uma população de células placentárias que compreendem as células-tronco placentárias quando a referida população é cultivada em condições que permitem a formação de corpos semelhantes a embrioides, ou expressam OCT-4 e facilitam a formação de um ou mais corpos semelhantes a embrioides corpos em uma população de células placentárias que compreende as células-tronco placentárias quando a referida população é cultivada em condições que permitem a formação de corpos semelhantes a embrioides; em que a referida composição suprime de forma detectável o crescimento ou proliferação de células tumorais, ou é anticâncer ou antiviral. Em uma modalidade específica, a composição compreende ainda uma pluralidade das referidas células aderentes placentárias isoladas. Em outra modalidade específica, a composição compreende uma pluralidade de células não placentárias. Em uma modalidade mais específica, as referidas células não placentárias compreendem células $CD34^{+}$, *por exemplo*, células progenitoras hematopoiéticas, tais como células progenitoras hematopoiéticas de sangue periférico, células progenitoras hematopoiéticas de sangue do cordão umbilical ou células progenitoras hematopoiéticas de sangue placentário. As células não

placentárias também podem compreender células-tronco, como células-tronco mesenquimais, *por exemplo*, células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea. As células não placentárias também podem ser um ou mais tipos de células ou linhas celulares adultas. Em outra modalidade específica, a composição compreende um agente antiproliferativo, *por exemplo*, um anticorpo anti-MIP-1α ou anti-MIP-1β.

[0424] Em uma modalidade específica, o meio de cultura condicionado por uma das células ou combinações de células descritas acima é obtido a partir de uma pluralidade de células aderentes da placenta isoladas co-cultivadas com uma pluralidade de células tumorais a uma razão de cerca de 1:1, cerca de 2:1, cerca de 3:1, cerca de 4:1, ou cerca de 5:1 células placentárias aderentes isoladas às células tumorais. Por exemplo, o meio de cultura condicionado ou sobrenadante pode ser obtido de uma cultura compreendendo cerca de 1 x 10^5 células placentárias aderentes isoladas, cerca de 1 x 10^6 células placentárias aderentes isoladas, cerca de 1 x 10^7 células placentárias aderentes isoladas ou cerca de 1 x 10^8 células placentárias aderentes isoladas células ou mais. Em outra modalidade específica, o meio de cultura condicionado ou sobrenadante é obtido de uma co-cultura compreendendo cerca de 1 x10^5 a cerca de 5 x 10^5 células placentárias aderentes isoladas e cerca de 1 x 10^5 células tumorais; cerca de 1 x 10^6 a cerca de 5 x 10^6 células placentárias aderentes isoladas e cerca de 1 x 10^6 células tumorais; cerca de 1 x 10^7 a cerca de 5 x 10^7 células placentárias aderentes isoladas e cerca de 1 x 10^7 células tumorais; ou cerca de 1 x 10^8 a cerca de 5 x 10^8 células placentárias aderentes isoladas e cerca de 1 x 10^8 células tumorais.

5.9. <u>Preservação de Células</u>

[0425] As células, *por exemplo*, células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos descritos neste documento, *por exemplo*, populações de

células NK e/ou células ILC3 produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, ou células de perfusato placentário compreendendo células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras, pode ser preservado, isto é, colocado sob condições que permitem o armazenamento de longo prazo, ou sob condições que inibem a morte celular por, *por exemplo*, apoptose ou necrose.

[0426] O perfusato placentário pode ser produzido pela passagem de uma composição de coleção de células através de pelo menos uma parte da placenta, *por exemplo*, através da vasculatura placentária. A composição de coleta de células compreende um ou mais compostos que atuam para preservar as células contidas no perfusato. Tal composição de coleta de células placentárias pode compreender um inibidor de apoptose, inibidor de necrose e/ou um perfluorocarbono portador de oxigênio, conforme descrito na Publicação de Pedido U.S. N° 20070190042 relacionada, cuja divulgação está aqui incorporada por referência em sua totalidade.

[0427] Em uma modalidade, o perfusato ou uma população de células placentárias são coletados de um mamífero, *por exemplo*, humano, placenta pós-parto, trazendo o perfusato ou população de células em proximidade com uma composição de coleta de células compreendendo um inibidor de apoptose e um transportador de oxigênio perfluorocarbono, em que o referido inibidor de apoptose está presente em uma quantidade e por um tempo suficiente para reduzir ou prevenir a apoptose na população de células placentárias, por exemplo, células placentárias aderentes, *por exemplo*, células-tronco placentárias ou células multipotentes placentárias, em comparação com um população de células não contatadas ou colocadas em proximidade com o inibidor de apoptose. Por exemplo, a placenta pode ser perfundida com a composição de coleta de células, e as células placentárias, *por exemplo*, células placentárias nucleadas totais, são isoladas dela. Em uma modalidade específica,

o inibidor da apoptose é um inibidor da caspase. Em outra modalidade específica, o referido inibidor de apoptose é um inibidor de JNK. Em uma modalidade mais específica, o referido inibidor de JNK não modula a diferenciação ou proliferação de células placentárias aderentes, *por exemplo*, células-tronco placentárias aderentes ou células aderentes multipotentes placentárias. Em outra modalidade, a composição de coleta de células compreende o referido inibidor de apoptose e o referido perfluorocarbono transportador de oxigênio em fases separadas. Em outra modalidade, a composição de coleta de células compreende o referido inibidor de apoptose e o referido perfluorocarbono transportador de oxigênio em uma emulsão. Em outra modalidade, a composição de coleta de células compreende adicionalmente um emulsificante, *por exemplo*, lecitina. Em outra modalidade, o referido inibidor de apoptose e o referido perfluorocarbono estão entre cerca de 0 °C e cerca de 25 °C no momento de aproximar as células placentárias da composição de coleta de células. Em outra modalidade mais específica, o referido inibidor de apoptose e o referido perfluorocarbono estão entre cerca de 2 °C e 10 °C, ou entre cerca de 2 °C e cerca de 5 °C, no momento de aproximar as células placentárias da composição de coleta de células. Em outra modalidade mais específica, a referida aproximação é realizada durante o transporte da referida população de células. Em outra modalidade mais específica, a referida aproximação é realizada durante o congelamento e descongelamento da referida população de células.

[0428] Em outra modalidade, o perfusato placentário e/ou células placentárias podem ser coletadas e preservadas trazendo o perfusato e/ou células em proximidade com um inibidor de apoptose e um composto de preservação de órgãos, em que o referido inibidor de apoptose está presente em uma quantidade e por um tempo suficiente para reduzir ou prevenir a

apoptose das células, em comparação com as células do perfusato ou da placenta não contatadas ou colocadas em proximidade com o inibidor da apoptose. Em uma modalidade específica, o composto de preservação de órgãos é uma solução UW (descrita na Patente U.S. No. 4.798.824; também conhecida como VIASPAN™; *ver também* Southard *et al*., *Transplantation* 49 (2): 251-257 (1990) ou uma solução descrita em Stern *et al*., Patente U.S. No. 5.552.267, cujas divulgações estão aqui incorporadas por referência na sua totalidade. Em outra modalidade, a referida composição de preservação de órgãos é hidroxietilamida, ácido lactobiônico, rafinose ou uma combinação dos mesmos. Em outra modalidade, a composição de coleta de células placentárias compreende adicionalmente um perfluorocarbono que transporta oxigênio, em duas fases ou como uma emulsão.

[0429] Em outra modalidade do método, as células placentárias são colocadas em proximidade com uma composição de coleta de células compreendendo um inibidor de apoptose e perfluorocarbono transportador de oxigênio, composto de preservação de órgãos ou uma combinação dos mesmos, durante a perfusão. Em outra modalidade, as células placentárias são colocadas em proximidade com o referido composto de coleta de células após a coleta por perfusão.

[0430] Normalmente, durante a coleta, enriquecimento e isolamento das células placentárias, é preferível minimizar ou eliminar o estresse celular devido à hipóxia e estresse mecânico. Em outra modalidade do método, portanto, o perfusato placentário ou uma população de células placentárias é exposta a uma condição de hipóxia durante a coleta, enriquecimento ou isolamento por menos de seis horas durante a referida preservação, em que uma condição de hipóxia é uma concentração de oxigênio que é menor do que a concentração normal de oxigênio no sangue. Em uma modalidade mais específica, o referido perfusato

ou população de células placentárias é exposta à referida condição de hipóxia por menos de duas horas durante a referida preservação. Em outra modalidade mais específica, a referida população de células placentárias é exposta à referida condição de hipóxia por menos de uma hora, ou menos de trinta minutos, ou não é exposta a uma condição de hipóxia, durante a coleta, enriquecimento ou isolamento. Em outra modalidade específica, a referida população de células placentárias não é exposta ao estresse de cisalhamento durante a coleta, enriquecimento ou isolamento.

[0431] Células, *por exemplo*, células de perfusato placentário, células hematopoiéticas, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas $CD34^+$; células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos; células placentárias aderentes isoladas fornecidas aqui podem ser criopreservadas, *por exemplo*, em meio de criopreservação em pequenos recipientes, *por exemplo*, ampolas ou frascos de septo. Em certas modalidades, as células aqui fornecidas são criopreservadas a uma concentração de cerca de 1×10^4 - 5×10^8 células por mL. Em modalidades específicas, as células aqui fornecidas são criopreservadas a uma concentração de cerca de 1×10^6 - $1,5 \times 10^7$ células por mL. Em modalidades mais específicas, as células aqui fornecidas são criopreservadas a uma concentração de cerca de 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, $1,5 \times 10^7$ células por mL.

[0432] O meio de criopreservação adequado inclui, mas não está limitado a, solução salina normal, meio de cultura incluindo, *por exemplo*, meio de crescimento ou meio de congelamento de células, por exemplo, meio de congelamento de células comercialmente disponível, *por exemplo*, C2695, C2639 ou C6039 (Sigma); CryoStor® CS2, CryoStor® CS5 ou CryoStor®CS10 (Soluções BioLife). Em uma modalidade, o meio de criopreservação compreende DMSO (dimetilsulfóxido), a uma concentração de, *por exemplo*, cerca de 1, 2, 3,

4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10% (v/v). O meio de criopreservação pode compreender agentes adicionais, por exemplo, metilcelulose, dextrano, albumina (*por exemplo*, albumina de soro humano), trealose e/ou glicerol. Em certas modalidades, o meio de criopreservação compreende cerca de 1% -10% de DMSO, cerca de 25% -75% de dextrano e/ou cerca de 20-60% de albumina de soro humano (HSA). Em certas modalidades, o meio de criopreservação compreende cerca de 1% -10% de DMSO, cerca de 25% -75% de trealose e/ou cerca de 20-60% de HSA humana. Em uma modalidade específica, o meio de criopreservação compreende 5% de DMSO, 55% de dextrano e 40% de HSA. Em uma modalidade mais específica, o meio de criopreservação compreende 5% de DMSO, 55% de dextrano (10% p/v em solução salina normal) e 40% de HSA. Em outra modalidade específica, o meio de criopreservação compreende 5% de DMSO, 55% de trealose e 40% de HSA. Em uma modalidade mais específica, o meio de criopreservação compreende 5% de DMSO, 55% de trealose (10% p/v em solução salina normal) e 40% de HSA. Em outra modalidade específica, o meio de criopreservação compreende CryoStor® CS5. Em outra modalidade específica, o meio de criopreservação compreende CryoStor®CS10.

[0433] As células fornecidas neste documento podem ser criopreservadas por qualquer um de uma variedade de métodos e em qualquer estágio de cultura, expansão ou diferenciação celular. Por exemplo, as células fornecidas neste documento podem ser criopreservadas logo após o isolamento dos tecidos ou órgãos de origem, *por exemplo*, perfusato placentário ou sangue do cordão umbilical, ou durante ou após a primeira, segunda ou terceira etapa dos métodos descritos acima. Em certas modalidades, as células hematopoiéticas, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras são criopreservadas em cerca de 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 minutos ou em cerca de 1, 2, 4, 6, 10, 12, 18, 20 ou 24 horas após o isolamento dos tecidos ou órgãos de

origem. Em certas modalidades, as referidas células são criopreservadas em 1, 2 ou 3 dias após o isolamento dos tecidos ou órgãos de origem. Em certas modalidades, as referidas células são criopreservadas após serem cultivadas em um primeiro meio, conforme descrito acima, por cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 dias. Em algumas modalidades, as referidas células são criopreservadas após serem cultivadas em um primeiro meio, conforme descrito acima, por cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 dias, e em um segundo meio por cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 dias, conforme descrito acima. Em algumas modalidades, quando as células NK são feitas usando um método de três estágios aqui descrito, as referidas células são criopreservadas após serem cultivadas em um primeiro meio cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 dias; e/ou após ser cultivado em um segundo meio cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 dias; e/ou depois de ser cultivado em um terceiro meio cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 dias. Em uma modalidade específica, as células NK e/ou células ILC3 são feitas usando um método de três estágios aqui descrito, e as referidas células são criopreservadas após serem cultivadas em um primeiro meio por 10 dias; após cultivo em segundo meio por 4 dias; e após cultivo em terceiro meio por 21 dias.

[0434] Em um aspecto, é fornecido aqui um método de criopreservação de uma população de células NK e/ou células ILC3, *por exemplo*, células NK e/ou células ILC3 produzidas por um método de três estágios aqui descrito. Em uma modalidade, o referido método compreende: cultura de células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras, *por exemplo*, células-tronco $CD34^+$ ou

células progenitoras, em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células, subsequentemente cultivando a referida primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células e, subsequentemente, a cultura da referida segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem um agente de mobilização de células-tronco e LMWH, para produzir uma terceira população de células, em que a terceira população de células compreende células exterminadoras naturais que são CD56 +, CD3-, CD16-ou CD16 + e CD94 + ou CD94-, e em que pelo menos 70%, ou pelo menos 80%, das células exterminadoras naturais são viáveis e, em seguida, criopreservando as células NK em um meio de criopreservação. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular. Em uma modalidade específica, a referida etapa de criopreservação compreende ainda (1) preparar uma solução de suspensão de células; (2) adicionar meio de criopreservação à solução de suspensão de células da etapa (1) para obter a suspensão de células criopreservadas; (3) resfriar a suspensão de células criopreservadas da etapa (3) para obter uma amostra criopreservada; e (4) armazenar a amostra criopreservada abaixo de -80 °C. Em certas modalidades, o

método não inclui etapas intermediárias.

[0435] Em uma modalidade, o referido método compreende: (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem LMWH, para produzir uma terceira população de células; em que a terceira população de células compreende células exterminadoras naturais que são CD56 +, CD3- e CD11a + e, em seguida, criopreservar as células NK em um meio de criopreservação. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular. Em uma modalidade específica, a referida etapa de criopreservação compreende ainda (1) preparar uma solução de suspensão de células; (2) adicionar meio de criopreservação à solução de suspensão de células da etapa (1) para obter a suspensão de células criopreservadas; (3) resfriar a suspensão de células criopreservadas da etapa (3) para obter uma amostra criopreservada; e (4) armazenar a amostra criopreservada abaixo de -80 °C. Em certas modalidades, o método não inclui etapas intermediárias.

[0436] Em uma modalidade, o referido método compreende: (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem cada um do fator de célula-tronco (SCF) e LMWH, para produzir uma terceira população de células; em que a terceira população de células compreende células exterminadoras naturais que são CD56 +, CD3- e CD11a + e, em seguida, criopreservar as células NK em um meio de criopreservação. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular. Em uma modalidade específica, a referida etapa de criopreservação compreende ainda (1) preparar uma solução de suspensão de células; (2) adicionar meio de criopreservação à solução de suspensão de células da etapa (1) para obter a suspensão de células criopreservadas; (3) resfriar a suspensão de células criopreservadas da etapa (3) para obter uma amostra criopreservada; e (4) armazenar a amostra criopreservada abaixo de -80 °C. Em certas modalidades, o método não inclui etapas intermediárias.

[0437] Em uma modalidade, o referido método compreende: (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e cada um de SCF, um agente de mobilização de célula-tronco, e LMWH, para produzir uma terceira população de células; em que a terceira população de células compreende células exterminadoras naturais que são CD56 +, CD3- e CD11a + e, em seguida, criopreservar as células NK em um meio de criopreservação. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular. Em uma modalidade específica, a referida etapa de criopreservação compreende ainda (1) preparar uma solução de suspensão de células; (2) adicionar meio de criopreservação à solução de suspensão de células da etapa (1) para obter a suspensão de células criopreservadas; (3) resfriar a suspensão de células criopreservadas da etapa (3) para obter uma amostra criopreservada; e (4) armazenar a amostra criopreservada abaixo de -80 °C. Em certas modalidades, o método não inclui etapas intermediárias.

[0438] Em uma modalidade, o referido método compreende: (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e cada um de um agente de mobilização de célula-tronco, e LMWH, para produzir uma terceira população de células; e (d) isolar células CD11a+ da terceira população de células para produzir uma quarta população de células; em que a quarta população de células compreende células exterminadoras naturais que são CD56 +, CD3- e CD11a + e, em seguida, criopreservar as células NK em um meio de criopreservação. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular. Em uma modalidade específica, a referida etapa de criopreservação compreende ainda (1) preparar uma solução de suspensão de células; (2) adicionar meio de criopreservação à solução de suspensão de células da etapa (1) para obter a suspensão de células criopreservadas; (3) resfriar a suspensão de células criopreservadas da etapa (3) para obter uma amostra criopreservada; e (4) armazenar a amostra criopreservada abaixo de -80 °C. Em certas modalidades, o

método não inclui etapas intermediárias.

[0439] Em uma modalidade, o referido método compreende: (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem LMWH, para produzir uma terceira população de células; em que a terceira população de células compreende células ILC3 que são CD56 +, CD3- e CD11a + e, em seguida, criopreservar as células ILC3 em um meio de criopreservação. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular. Em uma modalidade específica, a referida etapa de criopreservação compreende ainda (1) preparar uma solução de suspensão de células; (2) adicionar meio de criopreservação à solução de suspensão de células da etapa (1) para obter a suspensão de células criopreservadas; (3) resfriar a suspensão de células criopreservadas da etapa (3) para obter uma amostra criopreservada; e (4) armazenar a amostra criopreservada abaixo de -80 °C. Em certas modalidades, o método não inclui etapas intermediárias.

[0440] Em uma modalidade, o referido método compreende: (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo um agente de mobilização de célula-tronco, IL-2 e IL-15, e sem LMWH, para produzir uma terceira população de células; em que a terceira população de células compreende células ILC3 que são CD56 +, CD3- e CD11a - e, em seguida, criopreservar as células ILC3 em um meio de criopreservação. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular. Em uma modalidade específica, a referida etapa de criopreservação compreende ainda (1) preparar uma solução de suspensão de células; (2) adicionar meio de criopreservação à solução de suspensão de células da etapa (1) para obter a suspensão de células criopreservadas; (3) resfriar a suspensão de células criopreservadas da etapa (3) para obter uma amostra criopreservada; e (4) armazenar a amostra criopreservada abaixo de -80 °C. Em certas modalidades, o método não inclui etapas intermediárias.

[0441] Em uma modalidade, o referido método compreende: (a) cultivar

células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo SCF, IL-2 e IL-15, e sem LMWH, para produzir uma terceira população de células; em que a terceira população de células compreende células ILC3 que são CD56 +, CD3- e CD11a - e, em seguida, criopreservar as células ILC3 em um meio de criopreservação. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular. Em uma modalidade específica, a referida etapa de criopreservação compreende ainda (1) preparar uma solução de suspensão de células; (2) adicionar meio de criopreservação à solução de suspensão de células da etapa (1) para obter a suspensão de células criopreservadas; (3) resfriar a suspensão de células criopreservadas da etapa (3) para obter uma amostra criopreservada; e (4) armazenar a amostra criopreservada abaixo de -80 °C. Em certas modalidades, o método não inclui etapas intermediárias.

[0442] Em uma modalidade, o referido método compreende: (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio

compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo um agente de mobilização de célula-tronco, IL-2 e IL-15, e sem LMWH, para produzir uma terceira população de células; em que a terceira população de células compreende células ILC3 que são CD56 +, CD3- e CD11a - e, em seguida, criopreservar as células ILC3 em um meio de criopreservação. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular. Em uma modalidade específica, a referida etapa de criopreservação compreende ainda (1) preparar uma solução de suspensão de células; (2) adicionar meio de criopreservação à solução de suspensão de células da etapa (1) para obter a suspensão de células criopreservadas; (3) resfriar a suspensão de células criopreservadas da etapa (3) para obter uma amostra criopreservada; e (4) armazenar a amostra criopreservada abaixo de -80 °C. Em certas modalidades, o método não inclui etapas intermediárias.

[0443] Em uma modalidade, o referido método compreende: (a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina

(Tpo) para produzir uma primeira população de células; (b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; (c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e cada um de um agente de mobilização de célula-tronco, e LMWH, para produzir uma terceira população de células; e (d) isolar células CD11a- da terceira população de células para produzir uma quarta população de células; em que a quarta população de células compreende células ILC3 que são CD56 +, CD3- e CD11a - e, em seguida, criopreservar as células ILC3 em um meio de criopreservação. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular. Em uma modalidade específica, a referida etapa de criopreservação compreende ainda (1) preparar uma solução de suspensão de células; (2) adicionar meio de criopreservação à solução de suspensão de células da etapa (1) para obter a suspensão de células criopreservadas; (3) resfriar a suspensão de células criopreservadas da etapa (3) para obter uma amostra criopreservada; e (4) armazenar a amostra criopreservada abaixo de -80 °C. Em certas modalidades, o método não inclui etapas intermediárias.

[0444] As células fornecidas neste documento podem ser resfriadas em um freezer de taxa controlada, *por exemplo*, a cerca de 0,1, 0,3, 0,5, 1 ou 2 °C/min

durante a criopreservação. Em uma modalidade, a temperatura de criopreservação é de cerca de -80 °C a cerca de -180 °C, ou cerca de -125 °C a cerca de -140 °C. As células criopreservadas podem ser transferidas para nitrogênio líquido antes do descongelamento para uso. Em algumas modalidades, por exemplo, uma vez que as ampolas atingiram cerca de -90 °C, elas são transferidas para uma área de armazenamento de nitrogênio líquido. As células criopreservadas podem ser descongeladas a uma temperatura de cerca de 25 °C a cerca de 40 °C, mais especificamente podem ser descongeladas a uma temperatura de cerca de 37 °C. Em certas modalidades, as células criopreservadas são descongeladas após serem criopreservadas por cerca de 1, 2, 4, 6, 10, 12, 18, 20 ou 24 horas, ou por cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 dias. Em certas modalidades, as células criopreservadas são descongeladas após serem criopreservadas por cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 meses. Em certas modalidades, as células criopreservadas são descongeladas após serem criopreservadas por cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 anos.

[0445] O meio de descongelamento adequado inclui, mas não está limitado a, solução salina normal, meio de cultura de plasmalyte incluindo, por exemplo, meio de crescimento, *por exemplo*, meio RPMI. Em certas modalidades, o meio de descongelamento compreende um ou mais dos suplementos de meio (*por exemplo*, nutrientes, citocinas e/ou fatores). Suplementos de meio adequados para descongelamento de células fornecidos neste documento incluem, por exemplo, sem limitação, soro tal como soro humano AB, soro fetal bovino (FBS) ou soro fetal de bezerro (FCS), vitaminas, albumina sérica humana (HSA), albumina sérica bovina (BSA), aminoácidos (*por exemplo*, L-glutamina), ácidos graxos (*por exemplo*, ácido oleico, ácido linoleico ou ácido palmítico), insulina

(*por exemplo*, insulina humana recombinante), transferrina (transferrina humana saturada com ferro), β-mercaptoetanol, célula-tronco fator (SCF), ligante de tirosina quinase 3 semelhante a Fms (Flt3-L), citocinas como interleucina-2 (IL-2), interleucina-7 (IL-7), interleucina-15 (IL-15), trombopoietina (Tpo) ou heparina. Em uma modalidade específica, o meio de descongelamento útil nos métodos fornecidos neste documento compreende RPMI. Em outra modalidade específica, o referido meio de descongelamento compreende plasmalyte. Em outra modalidade específica, o referido meio de descongelamento compreende cerca de 0,5-20% de FBS. Em outra modalidade específica, o referido meio de descongelamento compreende cerca de 1, 2, 5, 10, 15 ou 20% de FBS. Em outra modalidade específica, o referido meio de descongelamento compreende cerca de 0,5% -20% de HSA. Em outra modalidade específica, o referido meio de descongelamento compreende cerca de 1, 2.5, 5, 10, 15, ou 20% de HSA. Em uma modalidade mais específica, o referido meio de descongelamento compreende RPMI e cerca de 10% de FBS. Em outra modalidade mais específica, o referido meio de descongelamento compreende plasmalyte e cerca de 5% de HSA.

[0446] Os métodos de criopreservação fornecidos neste documento podem ser otimizados para permitir o armazenamento de longo prazo ou sob condições que inibem a morte celular por, *por exemplo*, apoptose ou necrose. Em uma modalidade, as células pós-descongelamento compreendem mais de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 98% de células viáveis, conforme determinado por, *por exemplo*, contador automático de célula ou método de azul tripano. Em outra modalidade, as células pós-descongelamento compreendem cerca de 0,5, 1, 5, 10, 15, 20 ou 25% das células mortas. Em outra modalidade, as células pós-descongelamento compreendem cerca de 0,5, 1, 5, 10, 15, 20 ou 25% das células apoptóticas iniciais. Em outra modalidade, cerca

de 0,5, 1, 5, 10, 15 ou 20% das células pós-descongelamento sofrem apoptose após 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 dias após ser descongelado, *por exemplo*, conforme determinado por um ensaio de apoptose (*por exemplo*, TO-PRO3 ou Kit de ensaio de apoptose AnnV/PI). Em certas modalidades, as células pós-descongelamento são criopreservadas novamente após serem cultivadas, expandidas ou diferenciadas usando métodos aqui fornecidos.

5.10. Composições Compreendendo Células NK e/ou Células ILC3

5.10.1. Células NK e/ou Células ILC3 Produzidas Usando o Método de Três Estágios

[0447] Em algumas modalidades, é fornecida aqui uma composição, *por exemplo*, uma composição farmacêutica, compreendendo uma população de células NK e/ou células ILC3 isolada produzida usando o método de três estágios aqui descrito. Em uma modalidade específica, a referida população de células NK e/ou ILC3 isolada é produzida a partir de células hematopoiéticas, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras isoladas de perfusato placentário, sangue do cordão umbilical e/ou sangue periférico. Em outra modalidade específica, a referida população de células NK e /ou ILC3 isolada compreende pelo menos 50% das células na composição. Em outra modalidade específica, a referida célula NK isolada e/ou população de células ILC3, *por exemplo*, células $CD3^{-}CD56^{+}$, compreende pelo menos 80%, 85%, 90%. 95%, 98% ou 99% das células na composição. Em certas modalidades, não mais do que 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% ou 40% das células na referida população de células NK e/ou células ILC3 isolada são células $CD3^{-}CD56^{+}$. Em certas modalidades, as referidas células $CD3^{-}CD56^{+}$ são $CD16^{-}$.

[0448] As populações de células NK e/ou células ILC3 produzidas usando o método de três estágios aqui descrito podem ser formuladas em composições

farmacêuticas para uso *in vivo.* Essas composições farmacêuticas compreendem uma população de células NK e/ou células ILC3 em um transportador farmaceuticamente aceitável, *por exemplo,* uma solução salina ou outra solução fisiologicamente aceitável aceita para administração *in vivo.* As composições farmacêuticas da invenção podem compreender qualquer uma das populações de células NK e/ou células ILC3 descritas em outro lugar neste documento.

[0449] As composições farmacêuticas da invenção compreendem populações de células que compreendem 50% de células viáveis ou mais (isto é, pelo menos 50% das células *na* população são funcionais ou vivas). Preferencialmente, pelo menos 60% das células da população são viáveis. Mais preferencialmente, pelo menos 70%, 80%, 90%, 95% ou 99% das células na população na composição farmacêutica são viáveis.

[0450] As composições farmacêuticas da invenção podem compreender um ou mais compostos que, *por exemplo,* facilitam o enxerto; estabilizantes, tais como albumina, dextrana 40, gelatina, hidroxietilamido e semelhantes.

[0451] Quando formulada como uma solução injetável, em uma modalidade, a composição farmacêutica da invenção compreende cerca de 1,25% de HSA e cerca de 2,5% de dextrana. Outras formulações injetáveis, adequadas para a administração de produtos celulares, podem ser utilizadas.

[0452] Em uma modalidade, as composições, *por exemplo*, composições farmacêuticas, fornecidas neste documento, são adequadas para administração sistêmica ou local. Em modalidades específicas, as composições, *por exemplo*, composições farmacêuticas, fornecidas neste documento são adequadas para administração parenteral. Em modalidades específicas, as composições, *por exemplo*, composições farmacêuticas, fornecidas neste documento, são adequadas para injeção, infusão, administração intravenosa (IV), administração intrafemoral ou administração intratumoral. Em modalidades específicas, as

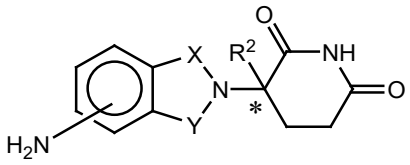
composições, *por exemplo*, composições farmacêuticas, fornecidas neste documento, são adequadas para administração por meio de um dispositivo, uma matriz ou um andaime. Em modalidades específicas, as composições, *por exemplo*, composições farmacêuticas, fornecidas neste documento são adequadas para injeção. Em modalidades específicas, as composições, *por exemplo*, composições farmacêuticas, fornecidas neste documento são adequadas para administração por meio de cateter. Em modalidades específicas, as composições, *por exemplo*, composições farmacêuticas, fornecidas neste documento são adequadas para injeção local. Em modalidades mais específicas, as composições, *por exemplo*, composições farmacêuticas, fornecidas aqui são adequadas para injeção local diretamente em um tumor sólido (*por exemplo*, um sarcoma). Em modalidades específicas, as composições, *por exemplo*, composições farmacêuticas, fornecidas neste documento são adequadas para injeção por seringa. Em modalidades específicas, as composições, *por exemplo*, composições farmacêuticas, fornecidas neste documento são adequadas para administração por meio de administração guiada. Em modalidades específicas, as composições, *por exemplo*, composições farmacêuticas, fornecidas neste documento, são adequadas para injeção auxiliada por laparoscopia, endoscopia, ultrassom, tomografia computadorizada, ressonância magnética ou radiologia.

[0453] Em certas modalidades, as composições, *por exemplo*, composições farmacêuticas fornecidas neste documento, compreendendo células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos descritos neste documento, são fornecidas como unidades administráveis de grau farmacêutico. Essas unidades podem ser fornecidas em volumes discretos, *por exemplo*, 15 mL, 20 mL, 25 mL, 30 nL. 35 mL, 40 mL, 45 mL, 50 mL, 55 mL, 60 mL, 65 mL, 70 mL, 75 mL, 80 mL, 85 mL, 90 mL, 95 mL, 100 mL, 150 mL, 200 mL, 250 mL, 300 mL, 350 mL, 400 mL, 450 mL, 500 mL ou semelhantes. Essas unidades podem ser fornecidas de modo

a conter um número especificado de células, *por exemplo,* células NK e/ou células ILC3, *por exemplo*, 1 x 10^4, 5 x 10^4, 1 x 10^5, 5 x 10^5, 1 x 10^6, 5 x 10^6, 1 x 10^7, 5 x 10^7, 1 x 10^8, 5 x 10^8 ou mais células por mililitro, ou 1 x 10^4, 5 x 10^4, 1 x 10^5, 5 x 10^5, 1 x 10^6, 5 x 10^6, 1 x 10^7, 5 x 10^7, 1 x 10^8, 5 x 10^8, 1 x 10^9, 5 x 10^9, 1 x 10^{10}, 5 x 10^{10}, 1 x 10^{11} ou mais células por unidade. Em modalidades específicas, as unidades podem compreender cerca de, pelo menos cerca de, ou no máximo cerca de 1 x 10^4, 5 x 10^4, 1 x 10^5, 5 x 10^5, 1 x 10^6, 5 x 10^6 ou mais células NK e/ou células ILC3 por mililitro, ou 1 x 10^4, 5 x 10^4, 1 x 10^5, 5 x 10^5, 1 x 10^6, 5 x 10^6, 1 x 10^7, 5 x 10^7, 1 x 10^8, 5 x 10^8, 1 x 10^9, 5 x 10^9, 1 x 10^{10}, 5 x 10^{10}, 1 x 10^{11} ou mais células por unidade. Essas unidades podem ser fornecidas para conter números especificados de células NK e/ou células ILC3 ou populações de células NK e/ou células ILC3 e/ou qualquer uma das outras células. Em modalidades específicas, as células NK e as células ILC3 estão presentes nas razões aqui providas.

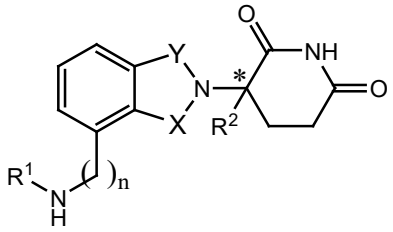
[0454] Em outra modalidade específica, as referidas células NK e/ou células ILC3 isoladas na referida composição são de um único indivíduo. Em uma modalidade mais específica, as referidas células NK e/ou células ILC3 isoladas compreendem células NK e/ou células ILC3 de pelo menos dois indivíduos diferentes. Em outra modalidade específica, as referidas células NK e/ou células ILC3 isoladas na referida composição são de um indivíduo diferente do indivíduo para o qual o tratamento com as células NK e/ou células ILC3 se destina. Em outra modalidade específica, as referidas células NK foram colocadas em contato ou colocadas em proximidade com um composto imunomodulador ou talidomida em uma quantidade e por um tempo suficiente para as referidas células NK expressarem de forma detectável mais granzima B ou perforina do que um número equivalente de células exterminadoras naturais, isto é, células NK, não contatadas ou colocadas em proximidade com o referido composto imunomodulador ou talidomida. Em outra modalidade específica, a referida

composição compreende adicionalmente um composto imunomodulador ou talidomida. Em certas modalidades, o composto imunomodulador é um composto descrito abaixo. *Ver*, *por exemplo*, Patente U.S. No. 7.498.171, cuja divulgação está aqui incorporada por referência em sua totalidade. Em certas modalidades, o composto imunomodulador é uma isoindolina substituída por amino. Em uma modalidade, o composto imunomodulador é 3- (4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il) -piperidina-2,6-diona; 3- (4'aminoisolindolina-1'-ona) -1-piperidina-2,6-diona; 4- (amino) -2- (2,6-dioxo (3-piperidil)) - isoindolina-1,3-diona; ou 4-Amino-2- (2,6-dioxopiperidin-3-il) isoindol-1,3-diona. Em outra modalidade, o composto imunomodulador é pomalidomida ou lenalidomida. Em outra modalidade, o referido composto imunomodulador é um composto com a estrutura



,

em que um de X e Y é C = O, o outro de X e Y é C = O ou CH_2, e R^2 é hidrogênio ou alquila inferior, ou um sal, hidrato, solvato, clatrato, enantiômero, diastereômero, racemato farmaceuticamente aceitável, ou mistura de estereoisômeros dos mesmos. Em outra modalidade, o referido composto imunomodulador é um composto com a estrutura



,

em que um de X e Y é C = O e o outro é CH_2 ou C = O;

R^1 é H, (C_1–C_8)alquila, (C_3–C_7)cicloalquila, (C_2–C_8)alquenila, (C_2-C_8)alquinila, benzila, arila, (C_0-C_4)alquil–(C_1-C_6)heterocicloalquila, (C_0-C_4)alquil–

(C_2-C_5)heteroarila, $C(O)R^3$, $C(S)R^3$, $C(O)OR^4$, (C_1-C_8)alquil–$N(R^6)_2$, (C_1-C_8)alquil–OR^5, (C_1-C_8)alquil–$C(O)OR^5$, $C(O)NHR^3$, $C(S)NHR^3$, $C(O)NR^3R^{3'}$, $C(S)NR^3R^{3'}$ ou (C_1-C_8)alquil–$O(CO)R^5$;

R^2 é H , F, benzila, (C_1-C_8)alquila, (C_2-C_8)alquenila, ou (C_2-C_8)alquinila;

R^3 e $R^{3'}$ são independentemente (C_1-C_8)alquila, (C_3-C_7)cicloalquila, (C_2-C_8)alquenila, (C_2-C_8)alquinila, benzila, arila, (C_0-C_4)alquil–(C_1-C_6)heterocicloalquila, (C_0-C_4)alquil–(C_2-C_5)heteroarila, (C_0-C_8)alquil–$N(R^6)_2$, (C_1-C_8)alquil–OR^5, (C_1-C_8)alquil–$C(O)OR^5$, (C_1-C_8)alquil–$O(CO)R^5$, ou $C(O)OR^5$;

R^4 é (C_1-C_8)alquila, (C_2-C_8)alquenila, (C_2-C_8)alquinila, (C_1-C_4)alquil–OR^5, benzil, aril, (C_0-C_4)alquil–(C_1-C_6)heterocicloalquila, ou (C_0-C_4)alquil–(C_2-C_5)heteroarila;

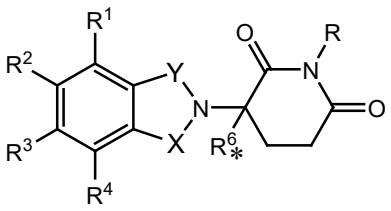
R^5 é (C_1-C_8)alquila, (C_2-C_8)alquenila, (C_2-C_8)alquinila, benzila, arila ou (C_2-C_5)heteroarila;

cada ocorrência de R^6 é independentemente H, (C_1-C_8)alquil, (C_2-C_8)alquenila, (C_2-C_8)alquinila, benzila, arila, (C_2-C_5)heteroarila ou (C_0-C_8)alquil–$C(O)O–R^5$ ou os grupos R^6 podem ser unir para formar um grupo heterocicloalquila;

n é 0 ou 1; e

* representa um centro de carbono quiral;

ou um sal, hidrato, solvato, clatrato, enantiômero, diastereômero, racemato farmaceuticamente aceitável ou mistura de estereoisômeros dos mesmos. Em outra modalidade, o referido composto imunomodulador é um composto com a estrutura



em que:

um de X e Y é C = O e o outro é CH_2 ou C = O;

R é H ou CH_2OCOR';

(i) cada um de R^1, R^2, R^3, or R^4, independentemente dos outros, é halo, alquil de 1 a 4 átomos de carbono ou alcóxi de 1 a 4 átomos de carbono ou (ii) um de R^1, R^2, R^3, ou R^4 é nitro ou -NHR^5 e o restante de R^1, R^2, R^3, ou R^4 é hidrogênio;

R^5 é hidrogênio ou alquila de 1 a 8 carbonos

R^6 hidrogênio, alquila de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro ou flúor;

R' é R^7-CHR^{10}-$N(R^8R^9)$;

R^7 é m-fenileno ou p-fenileno ou -(C_nH_{2n})- em que n tem um valor de 0 a 4;

cada um de R^8 e R^9 considerado independentemente um do outro é hidrogênio ou alquil de 1 a 8 átomos de carbono, ou R^8 e R^9 em conjunto são tetrametileno, pentametileno, hexametileno ou -$CH_2CH_2X_1CH_2CH_2$– em que X_1 é -O-, -S-, ou -NH-;

R^{10} é hidrogênio, alquila com até 8 átomos de carbono ou fenila; e

* representa um centro de carbono quiral;

ou um sal, hidrato, solvato, clatrato, enantiômero, diastereômero, racemato farmaceuticamente aceitável ou mistura de estereoisômeros dos mesmos.

[0455] Em outra modalidade específica, a composição compreende adicionalmente um ou mais compostos anticâncer, *por exemplo*, um ou mais dos compostos anticâncer descritos abaixo.

[0456] Em uma modalidade mais específica, a composição compreende células NK e/ou células ILC3 de outra fonte ou preparadas por outro método. Em uma modalidade específica, a referida outra fonte é sangue da placenta e/ou sangue do cordão umbilical. Em outra modalidade específica, a referida outra

fonte é sangue periférico. Em modalidades mais específicas, a população de células NK e/ou células ILC3 na referida composição é combinada com células NK e/ou células ILC3 de outra fonte, ou preparadas por outro método, em uma razão de cerca de 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 ou semelhantes.

[0457] Em outra modalidade específica, a composição compreende uma população de células NK e/ou células ILC3 produzida usando o método de três estágios aqui descrito e perfusado placentário isolado ou células de perfusato placentário isoladas. Em uma modalidade mais específica, o referido perfusato placentário é do mesmo indivíduo que a referida população de células NK e/ou células ILC3. Em outra modalidade mais específica, o referido perfusato placentário compreende perfusato placentário de um indivíduo diferente da referida população de células NK e/ou células ILC3. Em outra modalidade específica, todas ou substancialmente todas (*por exemplo*, mais de 90%, 95%, 98% ou 99%) das células no referido perfusato placentário são células fetais. Em outra modalidade específica, o perfusato da placenta ou células do perfusato da placenta compreendem células fetais e maternas. Em uma modalidade mais específica, as células fetais no referido perfusato placentário compreendem menos do que cerca de 90%, 80%, 70%, 60% ou 50% das células no referido perfusato. Em outra modalidade específica, o referido perfusato é obtido pela passagem de uma solução de NaCl a 0,9% através da vasculatura placentária. Em outra modalidade específica, o referido perfusato compreende um meio de cultura. Em outra modalidade específica, o referido perfusato foi tratado para remover eritrócitos. Em outra modalidade específica, a referida composição

compreende um composto imunomodulador, *por exemplo*, um composto imunomodulador descrito abaixo, *por exemplo*, um composto de isoindolina substituído com amino. Em outra modalidade específica, a composição compreende adicionalmente um ou mais compostos anticâncer, *por exemplo*, um ou mais dos compostos anticâncer descritos abaixo.

[0458] Em outra modalidade específica, a composição compreende uma população de células NK e/ou células ILC3 e células de perfusato placentário. Em uma modalidade mais específica, as referidas células do perfusato placentário são do mesmo indivíduo que a referida população de células NK e/ou células ILC3. Em outra modalidade mais específica, as referidas células de perfusato placentário são de um indivíduo diferente da referida população de células NK e/ou células ILC3. Em outra modalidade específica, a composição compreende células isoladas de perfusato placentário e células isoladas de perfusato placentário, em que o referido perfusato isolado e as referidas células isoladas de perfusato placentário são de indivíduos diferentes. Em outra modalidade mais específica de qualquer uma das modalidades acima compreendendo perfusato placentário, o referido perfusato placentário compreende perfusato placentário de pelo menos dois indivíduos. Em outra modalidade mais específica de qualquer uma das modalidades acima compreendendo células de perfusato da placenta, as referidas células de perfusato da placenta isoladas são de pelo menos dois indivíduos. Em outra modalidade específica, a referida composição compreende um composto imunomodulador. Em outra modalidade específica, a composição compreende adicionalmente um ou mais compostos anticâncer, *por exemplo*, um ou mais dos compostos anticâncer descritos abaixo.

5.11. Usos de Células NK e/ou Células ILC3 Produzidas Usando o Método de Três Estágios

[0459] As células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos

descritos neste documento, *por exemplo*, células NK e/ou células ILC3 produzidas de acordo com o método de três estágios aqui descrito, fornecido aqui podem ser usadas em métodos de tratamento de indivíduos com câncer, *por exemplo*, indivíduos com células tumorais sólidas e/ou células cancerosas do sangue, ou pessoas com infecção viral. Em algumas de tais modalidades, uma dosagem eficaz de células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos varia de 1×10^4 a 5×10^4, 5×10^4 a 1×10^5, 1×10^5 a 5×10^5, 5×10^5 a 1×10^6, 1×10^6 a 5×10^6, 5×10^6 a 1×10^7, mais células/quilograma de peso corporal. As células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos, também podem ser usadas em métodos de suprimir a proliferação de células tumorais.

5.11.1. Tratamento de Indivíduos com Câncer

[0460] Em uma modalidade, é fornecido aqui um método de tratamento de um indivíduo com um câncer, por exemplo, um câncer no sangue ou um tumor sólido, compreendendo a administração ao referido indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de células NK produzidas usando os métodos aqui descritos, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios aqui descrito. Em uma modalidade, é fornecido aqui um método de tratamento de um indivíduo com um câncer, por exemplo, um câncer no sangue ou um tumor sólido, compreendendo a administração ao referido indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos, *por exemplo*, populações de células ILC3 produzidas usando o método de três estágios aqui descrito. Em certas modalidades, o indivíduo tem uma deficiência de células exterminadoras naturais, *por exemplo*, uma deficiência de células NK ativas contra o câncer do indivíduo. Em uma modalidade específica, o método compreende adicionalmente a administração ao referido perfusato placentário

isolado individual ou células de perfusato placentário isoladas, *por exemplo*, uma quantidade terapeuticamente eficaz de perfusato placentário ou células de perfusato placentário isoladas. Em outra modalidade específica, o método compreende a administração adicional ao referido indivíduo de uma quantidade eficaz de um composto imunomodulador, *por exemplo*, um composto imunomodulador descrito acima, ou talidomida. Tal como aqui utilizado, uma "quantidade eficaz" é uma quantidade que, *por exemplo*, resulta em uma melhora detectável, diminuição da progressão ou eliminação de um ou mais sintomas de um câncer do qual o indivíduo sofre.

[0461] A administração de uma população isolada de células NK e/ou células ILC3 ou uma composição farmacêutica das mesmas pode ser sistêmica ou local. Em modalidades específicas, a administração é parenteral. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células NK e/ou células ILC3 ou uma composição farmacêutica da mesma a um sujeito é por injeção, infusão, administração intravenosa (IV), administração intrafemoral ou administração intratumoral. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células NK e/ou células ILC3 ou uma composição farmacêutica das mesmas a um sujeito é realizada com um dispositivo, uma matriz ou um suporte. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células NK e/ou células ILC3 ou uma composição farmacêutica das mesmas a um sujeito é por injeção. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células NK e/ou células ILC3 ou uma composição farmacêutica das mesmas a um sujeito é por meio de um cateter. Em modalidades específicas, a injeção de células NK e/ou células ILC3 é uma injeção local. Em modalidades mais específicas, a injeção local é diretamente em um tumor sólido (*por exemplo*, um sarcoma). Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células NK e/ou células

ILC3 ou uma composição farmacêutica das mesmas a um sujeito é por injeção por seringa. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células NK e/ou células ILC3 ou uma composição farmacêutica das mesmas a um sujeito é por meio de uma administração guiada. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células NK e/ou células ILC3 ou uma composição farmacêutica da mesma a um sujeito por injeção é auxiliada por laparoscopia, endoscopia, ultrassom, tomografia computadorizada, ressonância magnética ou radiologia.

[0462] Em uma modalidade específica, o câncer é um câncer do sangue, *por exemplo*, uma leucemia ou um linfoma. Em modalidades mais específicas, o câncer é uma leucemia aguda, *por exemplo*, leucemia aguda de células T, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda precursora B, leucemia linfoblástica aguda T precursora, Leucemia de Burkitt (linfoma de Burkitt) ou leucemia bifenotípica aguda; uma leucemia crônica, *por exemplo*, linfoma mieloide crônico, leucemia mielóide crônica (CML), leucemia monocítica crônica, leucemia linfocítica crônica (CLL)/Linfoma linfocítico pequeno ou leucemia prolinfocítica de células B; linfoma de células cabeludas; Leucemia prolinfocítica de células T; ou um linfoma, *por exemplo*, linfoma histiocítico, linfoma linfoplasmocitário (*por exemplo*, macroglobulinemia de Waldenström), linfoma de zona marginal esplênica, neoplasia de células plasmáticas (*por exemplo*, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma, uma doença de deposição de imunoglobulina monoclonal ou uma doença de cadeia pesada), extranodal linfoma de células B de zona (linfoma MALT), linfoma de células B de zona marginal nodal (NMZL), linfoma folicular, linfoma de células do manto, linfoma difuso de grandes células B, linfoma mediastinal (tímico) de grandes células B, linfoma intravascular de grandes

células B, linfoma de derrame primário, Leucemia linfocítica granular grande de células T, leucemia de células NK agressiva, leucemia/Linfoma de células T adultas, linfoma de células NK/T extranodal, tipo nasal, linfoma de células T do tipo enteropatia, linfoma de células T hepatoesplênico, linfoma de células NK blásticas, micose fungóide (Síndrome de Sézary), um distúrbio linfoproliferativo cutâneo primário de células T CD30-positivo (*por exemplo*, linfoma anaplásico cutâneo primário de células grandes ou papulose linfomatoide), linfoma de células T angiomunoblástico, linfoma de células T periférico, não especificado, linfoma anaplásico de células grandes, um linfoma de Hodgkin ou um linfoma de Hodgkin com predominância de linfócitos nodulares. Em outra modalidade específica, o câncer é mieloma múltiplo ou síndrome mielodisplásica.

[0463] Em certas outras modalidades específicas, o câncer é um tumor sólido, *por exemplo*, um carcinoma, tal como um adenocarcinoma, um carcinoma adrenocortical, um adenocarcinoma do cólon, um adenocarcinoma colorretal, um carcinoma colorretal, um carcinoma de células ductais, um carcinoma de pulmão, uma tireóide carcinoma, um carcinoma nasofaríngeo, um melanoma (*por exemplo*, um melanoma maligno), um carcinoma de pele não melanoma ou um carcinoma não especificado; um tumor desmóide; um tumor desmoplásico de pequenas células redondas; um tumor endócrino; um sarcoma de Ewing; um tumor de células germinativas (*por exemplo*, câncer testicular, câncer de ovário, coriocarcinoma, tumor do seio endodérmico, germinoma, *etc*.); um hepatosblastoma; um carcinoma hepatocelular; um neuroblastoma; um sarcoma de tecidos moles não rabdomiossarcoma; um osteossarcoma; um retinoblastoma; um rabdomiossarcoma; ou um tumor de Wilms. Em outra modalidade, o tumor sólido é câncer pancreático ou câncer de mama. Em outras modalidades, o tumor sólido é um neuroma acústico; um astrocitoma (*por exemplo*, um astrocitoma pilocítico de grau I, um astrocitoma de baixo grau de

grau II; um astrocitoma anaplásico de grau III; ou um glioblastoma multiforme de grau IV); um cordoma; um craniofaringioma; um glioma (*por exemplo*, um glioma do tronco cerebral; um ependimoma; um glioma misto; um glioma do nervo óptico; ou um subependimoma); um glioblastoma; um meduloblastoma; um meningioma; um tumor cerebral metastático; um oligodendroglioma; um pinhooblastoma; um tumor hipofisário; um tumor neuroectodérmico primitivo; ou um schwannoma. Em outra modalidade, o câncer é câncer de próstata. Em outra modalidade, o câncer é câncer de fígado. Em outra modalidade, o câncer é câncer de pulmão. Em outra modalidade, o câncer é câncer renal.

[0464] Em certas modalidades, o indivíduo com um câncer, por exemplo, um câncer no sangue ou um tumor sólido, *por exemplo*, um indivíduo com uma deficiência de células exterminadoras naturais, é um indivíduo que recebeu um transplante de medula óssea antes da referida administração. Em certas modalidades, o transplante de medula óssea estava em tratamento do referido câncer. Em certas outras modalidades, o transplante de medula óssea estava em tratamento de uma condição diferente do câncer. Em certas modalidades, o indivíduo recebeu um imunossupressor além do referido transplante de medula óssea. Em certas modalidades, o indivíduo que teve um transplante de medula óssea exibe um ou mais sintomas de doença do enxerto contra hospedeiro (GVHD) no momento da referida administração. Em certas outras modalidades, o indivíduo que teve um transplante de medula óssea é administrado as referidas células antes de um sintoma de GVHD se manifestar.

[0465] Em certas modalidades específicas, o indivíduo com câncer, por exemplo, um câncer no sangue, recebeu pelo menos uma dose de um inibidor de TNFα, *por exemplo*, ETANERCEPT® (Enbrel), antes da referida administração. Em modalidades específicas, o referido indivíduo recebeu a referida dose de um inibidor de TNFα dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 meses após o

diagnóstico do referido câncer. Em uma modalidade específica, o indivíduo que recebeu uma dose de um inibidor de TNFα exibe leucemia mieloide aguda. Em uma modalidade mais específica, o indivíduo que recebeu uma dose de um inibidor de TNFα e exibe leucemia mieloide aguda exibe ainda deleção do braço longo do cromossomo 5 nas células sanguíneas. Em outra modalidade, o indivíduo com câncer, por exemplo, um câncer no sangue, exibe um cromossomo Filadélfia.

[0466] Em certas outras modalidades, o câncer, por exemplo, um câncer no sangue ou um tumor sólido, no referido indivíduo é refratário a um ou mais medicamentos anticâncer. Em uma modalidade específica, o câncer é refratário a GLEEVEC® (mesilato de imatinibe).

[0467] Em certas modalidades, o câncer, por exemplo, um câncer do sangue, no referido indivíduo responde a pelo menos um fármaco anticâncer; nesta modalidade, perfusato placentário, células de perfusato placentário isoladas, células exterminadoras naturais isoladas, *por exemplo*, células exterminadoras naturais da placenta, *por exemplo*, células exterminadoras naturais intermediárias derivadas da placenta, células exterminadoras naturais combinadas isoladas ou células NK aqui descritas e/ou combinações destes, e opcionalmente um composto imunomodulador, são adicionados como tratamentos adjuvantes ou como uma terapia de combinação com o referido fármaco anticâncer. Em certas outras modalidades, o indivíduo com câncer, por exemplo, um câncer no sangue, foi tratado com pelo menos um fármaco anticâncer e teve uma recidiva, antes da referida administração. Em certas modalidades, o indivíduo a ser tratado tem um câncer refratário. Em uma modalidade, o método de tratamento do câncer com as células aqui descritas protege contra (*por exemplo*, previne ou retarda) a recidiva do câncer. Em uma modalidade, o método de tratamento do câncer aqui descrito resulta na

remissão do câncer por 1 mês ou mais, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 meses ou mais, 1 ano ou mais, 2 anos ou mais, 3 anos ou mais, ou 4 anos ou mais.

[0468] Em uma modalidade, é fornecido aqui um método de tratamento de um indivíduo com mieloma múltiplo, compreendendo a administração ao indivíduo de (1) lenalidomida; (2) melfalano; e (3) células NK, em que as referidas células NK são eficazes para tratar mieloma múltiplo no referido indivíduo. Em uma modalidade específica, as referidas células NK são células NK do cordão umbilical ou células NK produzidas a partir de células hematopoiéticas do sangue do cordão, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas. Em outra modalidade, as referidas células NK foram produzidas por um método de três estágios aqui descrito para a produção de células NK. Em outra modalidade, as referidas células lenalidomida, melfalano e/ou NK são administradas separadamente umas das outras. Em certas modalidades específicas do método de tratar um indivíduo com mieloma múltiplo, as referidas células NK são produzidas poro um método que compreende: cultura de células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras, por *exemplo*, células-tronco $CD34^+$ ou células progenitoras, em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células, subsequentemente cultivando a referida primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células e, subsequentemente, a cultura da referida segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem um agente de mobilização de células-tronco e LMWH, para produzir uma terceira população de células, em que a terceira população de células compreende células exterminadoras naturais que são CD56+, CD3-, CD16– ou CD16+, e CD94+ ou CD94-, e em que pelo menos 70%, ou pelo menos 80%, das células

exterminadoras naturais são viáveis. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[0469] Em outra modalidade, é fornecido aqui um método de tratamento de um indivíduo com leucemia mieloide aguda (AML), compreendendo a administração às células NK individuais (opcionalmente ativadas por pré-tratamento com IL2 somente, ou IL-15 somente, IL2 e IL12 e IL18, IL12 e IL15, IL12 e IL18, IL2 e IL12 e IL15 e IL18, ou IL2 e IL15 e IL18), em que as referidas células NK são eficazes para tratar AML no referido indivíduo. Em uma modalidade específica, a população de células NK isolada produzida usando os métodos de três estágios aqui descritos foi pré-tratada com um ou mais de IL2, IL12, IL18 ou IL15 antes da referida administração. Em uma modalidade específica, as referidas células NK são células NK do cordão umbilical ou células NK produzidas a partir de células hematopoiéticas do sangue do cordão, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas. Em outra modalidade, as referidas células NK foram produzidas por um método de três estágios aqui descrito para a produção de células NK. Em certas modalidades específicas do método de tratamento de um indivíduo com AML, as referidas células NK são produzidas por um método de três estágios, conforme descrito neste documento. Em uma modalidade particular, a AML a ser tratada pelos métodos anteriores compreende AML refratária, AML de mau prognóstico ou AML infantil. Os

métodos conhecidos na técnica para a administração de células NK para o tratamento de AML refratária, AML de mau prognóstico ou AML infantil podem ser adaptados para este propósito; ver, *por exemplo*, Miller et al., 2005, Blood 105: 3051-3057; Rubnitz et al., 2010, J Clin Oncol. 28: 955-959, cada um dos quais está incorporado neste documento por referência em sua totalidade. Em certas modalidades, o referido indivíduo tem AML que falhou em pelo menos uma AML contra terapêutica por célula não exterminadora natural. Em modalidades específicas, o referido indivíduo tem 65 anos ou mais e está em primeira remissão. Em modalidades específicas, o referido indivíduo foi condicionado com fludarabina, citarabina ou ambos antes da administração das referidas células exterminadoras naturais.

[0470] Em uma modalidade, é fornecido aqui um método de tratamento de um indivíduo com mieloma múltiplo, compreendendo a administração ao indivíduo de (1) lenalidomida; (2) melfalano; e (3) células ILC3, em que as referidas células ILC3 são eficazes para tratar mieloma múltiplo no referido indivíduo. Em uma modalidade específica, as referidas células ILC3 são células ILC3 do cordão umbilical ou células ILC3 produzidas a partir de células hematopoiéticas do sangue do cordão, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas. Em outra modalidade, as referidas células ILC3 foram produzidas por um método de três estágios aqui descrito para a produção de células ILC3. Em outra modalidade, as referidas células lenalidomida, melfalano e/ou ILC3 são administradas separadamente umas das outras. Em certas modalidades específicas do método de tratar um indivíduo com mieloma múltiplo, as referidas células ILC3 são produzidas poro um método que compreende: cultura de células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras, por *exemplo*, células-tronco $CD34^+$ ou células progenitoras, em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e

trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células, subsequentemente cultivando a referida primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células e, subsequentemente, a cultura da referida segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem um agente de mobilização de células-tronco e LMWH, para produzir uma terceira população de células, em que a terceira população de células compreende células exterminadoras naturais que são CD56+, CD3-, CD16– ou CD16+, e CD94+ ou CD94-, e em que pelo menos 70%, ou pelo menos 80%, das células exterminadoras naturais são viáveis. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[0471] Em outra modalidade, é fornecido aqui um método de tratamento de um indivíduo com leucemia mieloide aguda (AML), compreendendo a administração às células ILC3 individuais (opcionalmente ativadas por pré-tratamento com IL2 e IL12 e IL18, IL12 e IL15, IL12 e IL18, IL2 e IL12 e IL15 e IL18, ou IL2 e IL15 e IL18), em que as referidas células ILC3 são eficazes para tratar AML no referido indivíduo. Em uma modalidade específica, a população de células ILC3 isolada produzida usando os métodos de três estágios aqui descritos foi pré-tratada com um ou mais de IL2, IL12, IL18 ou IL15 antes da referida

administração. Em uma modalidade específica, as referidas células ILC3 são células ILC3 do cordão umbilical ou células ILC3 produzidas a partir de células hematopoiéticas do sangue do cordão, *por exemplo*, células-tronco hematopoiéticas. Em outra modalidade, as referidas células ILC3 foram produzidas por um método de três estágios aqui descrito para a produção de células ILC3. Em certas modalidades específicas do método de tratamento de um indivíduo com AML, as referidas células ILC3 são produzidas por um método de três estágios, conforme descrito neste documento. Em uma modalidade particular, a AML a ser tratada pelos métodos anteriores compreende AML refratária, AML de mau prognóstico ou AML infantil. Os métodos conhecidos na técnica para a administração de células ILC3 para o tratamento de AML refratária, AML de mau prognóstico ou AML infantil podem ser adaptados para este propósito; ver, *por exemplo*, Miller et al., 2005, Blood 105: 3051-3057; Rubnitz et al., 2010, J Clin Oncol. 28: 955-959, cada um dos quais está incorporado neste documento por referência em sua totalidade. Em certas modalidades, o referido indivíduo tem AML que falhou em pelo menos uma AML contra terapêutica por célula não exterminadora natural. Em modalidades específicas, o referido indivíduo tem 65 anos ou mais e está em primeira remissão. Em modalidades específicas, o referido indivíduo foi condicionado com fludarabina, citarabina ou ambos antes da administração das referidas células exterminadoras naturais.

[0472] Em outras modalidades específicas do método de tratar um indivíduo com AML, as referidas células NK são produzidas por um método que compreende: cultivar células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras, *por exemplo*, células-tronco $CD34^+$ ou células progenitoras, em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células,

subsequentemente cultivando a referida primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células e, subsequentemente, a cultura da referida segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem um agente de mobilização de células-tronco e LMWH, para produzir uma terceira população de células, em que a terceira população de células compreende células exterminadoras naturais que são CD56+, CD3-, CD16– ou CD16+, e CD94+ ou CD94-, e em que pelo menos 70%, ou pelo menos 80%, das células exterminadoras naturais são viáveis. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

[0473] Em outra modalidade, é fornecido aqui um método de tratamento de um indivíduo com leucemia linfocítica crônica (CLL), compreendendo a administração ao indivíduo de uma dose terapeuticamente eficaz de (1) lenalidomida; (2) melfalano; (3) fludarabina; e (4) células NK, *por exemplo*, células NK produzida por um método de três estágios aqui descrito, em que as referidas células NK são eficazes para tratar a referida CLL no referido indivíduo. Em uma modalidade específica, as referidas células NK são células NK do cordão umbilical ou células NK produzidas a partir de células-tronco hematopoiéticas do sangue do cordão. Em outra modalidade, as referidas células NK foram

produzidas por um método de três estágios aqui descrito para a produção de células NK. Em uma modalidade específica de qualquer um dos métodos acima, as referidas células lenalidomida, melfalan, fludarabina e NK expandidas são administradas ao referido indivíduo separadamente. Em certas modalidades específicas do método de tratar um indivíduo com CLL, as referidas células NK são produzidas poro um método que compreende: cultura de células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras, *por exemplo*, células-tronco $CD34^+$ ou células progenitoras, em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células, subsequentemente cultivando a referida primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células e, subsequentemente, a cultura da referida segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem um agente de mobilização de células-tronco e LMWH, para produzir uma terceira população de células, em que a terceira população de células compreende células exterminadoras naturais que são CD56+, CD3-, CD16– ou CD16+, e CD94+ ou CD94-, e em que pelo menos 70%, ou pelo menos 80%, das células exterminadoras naturais são viáveis. Em certas modalidades, o referido primeiro meio e/ou o referido segundo meio não possui fator de inibição de leucemia (LIF) e/ou proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1α). Em certas modalidades, o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e ligante de tirosina quinase-3 semelhante a FMS (Flt-3L). Em modalidades específicas, o referido primeiro meio e o referido segundo meio não têm LIF e MIP-1α, e o referido terceiro meio não tem LIF, MIP-1α e Flt3L. Em certas modalidades, nenhum do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio compreende heparina, *por exemplo*, heparina de baixo peso molecular.

5.11.2. Supressão da Proliferação de Células Tumorais

[0474] Ainda é fornecido aqui um método de suprimir a proliferação de células tumorais, compreendendo trazer células NK produzidas usando os métodos aqui descritos, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, em proximidade com as células tumorais, *por exemplo*, contatar as células tumorais com células NK produzidas usando os métodos aqui descritos. Uma pluralidade das células NK pode assim ser usada no método de suprimir a proliferação das células tumorais compreendendo trazer uma quantidade terapeuticamente eficaz da população de células NK em proximidade com as células tumorais, *por exemplo*, colocando as células tumorais em contato com as células na população de células NK. Opcionalmente, células de perfusato placentário isoladas ou células de perfusato placentário isoladas são colocadas em proximidade com as células tumorais e/ou células NK produzidas usando os métodos aqui descritos. Em outra modalidade específica, um composto imunomodulador, *por exemplo*, um composto imunomodulador descrito acima, ou talidomida é adicionalmente colocado em proximidade com as células tumorais e/ou células NK produzidas usando os métodos aqui descritos, de modo que a proliferação das células tumorais seja detectavelmente reduzida em comparação com células tumorais do mesmo tipo não colocadas em proximidade com células NK produzidas usando os métodos aqui descritos. Opcionalmente, perfusato placentário isolado ou células de perfusato placentário isoladas são colocadas em proximidade com as células tumorais e/ou células NK produzidas usando os métodos aqui descritos que foram colocados em contato ou colocados em proximidade com um composto imunomodulador.

[0475] Também é fornecido aqui um método de suprimir a proliferação de células tumorais, compreendendo trazer células ILC3 produzidas usando os

métodos aqui descritos, *por exemplo*, populações de células ILC3 produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, em proximidade com as células tumorais, *por exemplo*, contatar as células tumorais com células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos. Uma pluralidade das células ILC3 pode ser assim usada no método de suprimir a proliferação das células tumorais compreendendo trazer uma quantidade terapeuticamente eficaz da população de células ILC3 em proximidade com as células tumorais, *por exemplo*, colocando as células tumorais em contato com as células na população de células ILC3. Opcionalmente, perfusato placentário isolado ou células de perfusato placentário isoladas são colocadas em proximidade com as células tumorais e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos. Em outra modalidade específica, um composto imunomodulador, *por exemplo*, um composto imunomodulador descrito acima, ou talidomida é adicionalmente colocado em proximidade com as células tumorais e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos, de modo que a proliferação das células tumorais seja detectavelmente reduzida em comparação com células tumorais do mesmo tipo não colocadas em proximidade com células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos. Opcionalmente, perfusato placentário isolado ou células de perfusato placentário isoladas são colocadas em proximidade com as células tumorais e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos que foram colocados em contato ou colocados em proximidade com um composto imunomodulador.

[0476] Tal como aqui utilizado, em certas modalidades, "colocar em contato" ou "colocar próximo", com relação às células, em uma modalidade engloba contato físico direto, *por exemplo*, célula-célula, entre o perfusato placentário, células do perfusato placentário, células exterminadoras naturais, *por exemplo*, populações de células NK produzidas de acordo com o método de

três estágios aqui descrito, células ILC3, *por exemplo*, populações de células ILC3 produzidas de acordo com o método de três estágios aqui descrito e/ou células exterminadoras naturais combinadas isoladas e as células tumorais. Em outra modalidade, "contato" abrange a presença no mesmo espaço físico, *por exemplo*, perfusato placentário, células de perfusato placentário, células exterminadoras naturais, *por exemplo*, células exterminadoras naturais placentárias intermediárias, células exterminadoras naturais descritas neste documento, *por exemplo*, populações de células NK produzidas de acordo com o método de três estágios aqui descrito, células ILC3 aqui descritas, *por exemplo*, populações de células ILC3 produzidas de acordo com o método de três estágios aqui descrito, e/ou células exterminadoras naturais combinadas isoladas são colocadas no mesmo recipiente (*por exemplo*, placa de cultura, placa multipoço) como células tumorais. Em outra modalidade, "contato" perfusato placentário, células de perfusato placentário, células exterminadoras naturais combinadas, células exterminadoras naturais placentárias intermediárias ou células exterminadoras naturais descritas neste documento, *por exemplo*, populações de células NK produzidas de acordo com o método de três estágios aqui descrito ou células ILC3 descrito aqui, *por exemplo*, populações de células ILC3 produzidas de acordo com o método de três estágios aqui descrito, e células tumorais são realizadas, *por exemplo*, por injeção ou infusão do perfusato placentário ou células, *por exemplo*, células de perfusato placentário, células exterminadoras naturais combinadas, células exterminadoras naturais, *por exemplo*, células exterminadoras naturais intermediárias da placenta, ou células ILC3, em um indivíduo, *por exemplo*, um ser humano compreendendo células tumorais, *por exemplo*, um paciente com câncer. "Contato", no contexto de compostos imunomoduladores e/ou talidomida, significa, *por exemplo*, que as células e o composto imunomodulador e/ou talidomida estão diretamente em contato

físico um com o outro, ou são colocados dentro do mesmo volume físico (*por exemplo*, um recipiente de cultura de células ou um indivíduo).

[0477] Em uma modalidade específica, as células tumorais são células cancerosas do sangue, *por exemplo*, células de leucemia ou células de linfoma. Em modalidades mais específicas, o câncer é uma leucemia aguda, *por exemplo*, leucemia aguda de células T, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda precursora B, leucemia linfoblástica aguda T precursora, Leucemia de Burkitt (linfoma de Burkitt) ou leucemia bifenotípica aguda; uma leucemia crônica, *por exemplo*, linfoma mieloide crônico, leucemia mielóide crônica (CML), leucemia monocítica crônica, leucemia linfocítica crônica (CLL)/Linfoma linfocítico pequeno ou leucemia prolinfocítica de células B; linfoma de células cabeludas; Leucemia prolinfocítica de células T; ou um linfoma, *por exemplo*, linfoma histiocítico, linfoma linfoplasmocitário (*por exemplo*, macroglobulinemia de Waldenström), linfoma de zona marginal esplênica, neoplasia de células plasmáticas (*por exemplo*, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma, uma doença de deposição de imunoglobulina monoclonal ou uma doença de cadeia pesada), extranodal linfoma de células B de zona (linfoma MALT), linfoma de células B de zona marginal nodal (NMZL), linfoma folicular, linfoma de células do manto, linfoma difuso de grandes células B, linfoma mediastinal (tímico) de grandes células B, linfoma intravascular de grandes células B, linfoma de derrame primário, Leucemia linfocítica granular grande de células T, leucemia de células NK agressiva, leucemia/Linfoma de células T adultas, linfoma de células NK/T extranodal, tipo nasal, linfoma de células T do tipo enteropatia, linfoma de células T hepatoesplênico, linfoma de células NK blásticas, micose fungóide (Síndrome de Sézary), um distúrbio linfoproliferativo cutâneo primário de células T CD30-positivo (*por exemplo*,

linfoma anaplásico cutâneo primário de células grandes ou papulose linfomatoide), linfoma de células T angiomunoblástico, linfoma de células T periférico, não especificado, linfoma anaplásico de células grandes, um linfoma de Hodgkin ou um linfoma de Hodgkin com predominância de linfócitos nodulares. Em outra modalidade específica, as células tumorais são células de mieloma múltiplo ou células de síndrome mielodisplásica.

[0478] Em modalidades específicas, as células tumorais são células tumorais sólidas, *por exemplo*, células de carcinoma, por exemplo, células de adenocarcinoma, células de carcinoma adrenocortical, células de adenocarcinoma do cólon, células de adenocarcinoma colorretal, células de carcinoma colorretal, células de carcinoma de células ductais, células de carcinoma pulmonar, carcinoma da tireóide células, células de carcinoma nasofaríngeo, células de melanoma (*por exemplo*, células de melanoma maligno), células de carcinoma de pele não melanoma ou células de carcinoma não especificadas; células tumorais desmoides; células tumorais desmoplásicas de células redondas pequenas; células tumorais endócrinas; Células de sarcoma de Ewing; células de tumor de células germinativas (*por exemplo*, células de câncer testicular, células de câncer de ovário, células de coriocarcinoma, células de tumor de seio endodérmico, células de germinoma, *etc*.); células de hepatosblastoma; células de carcinoma hepatocelular; células de neuroblastoma; células de sarcoma de tecidos moles não rabdomiossarcoma; células de osteossarcoma; células de retinoblastoma; células de rabdomiossarcoma; ou células tumorais de Wilms. Em outra modalidade, as células tumorais são células de câncer pancreático ou células de câncer de mama. Em outras modalidades, as células tumorais sólidas são células de neuroma acústico; células de astrocitoma (*por exemplo*, células de astrocitoma pilocítico de grau I, células de astrocitoma de baixo grau de grau II; células de

astrocitoma anaplásico de grau III; ou células de glioblastoma multiforme de grau IV); células cordoma; células de craniofaringioma; células de glioma (*por exemplo*, células de glioma do tronco cerebral; células de ependimoma; células de glioma mistas; células de glioma do nervo óptico; ou células de subependimoma); células de glioblastoma; células de meduloblastoma; células de meningioma; células tumorais cerebrais metastáticas; células de oligodendroglioma; células de pinoblastoma; células tumorais hipofisárias; células tumorais neuroectodérmicas primitivas; ou células de schwannoma. Em outra modalidade, as células tumorais são células de câncer de próstata.

[0479] Conforme usado neste documento, "terapeuticamente benéfico" e "benefícios terapêuticos" incluem, mas não estão limitados a, *por exemplo*, redução no tamanho de um tumor; diminuição ou cessação da expansão de um tumor; redução ou prevenção da doença metastática; redução no número de células cancerosas em uma amostra de tecido, por *exemplo*, uma amostra de sangue, por unidade de volume; a melhora clínica em qualquer sintoma do câncer ou tumor específico que o referido indivíduo tem, a diminuição ou cessação do agravamento de qualquer sintoma do câncer específico que o indivíduo tem, *etc*.

5.11.3. Tratamento de cânceres usando células NK e/ou células ILC3 e outros agentes anticâncer

[0480] O tratamento de um indivíduo com câncer usando as células NK produzidas usando os métodos descritos neste documento, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, pode ser parte de um regime de terapia anticâncer que inclui um ou mais outros agentes anticâncer. Da mesma forma, o tratamento de um indivíduo com câncer usando as células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos, *por exemplo*, populações de células ILC3 produzidas usando o método de três

estágios aqui descrito, pode ser parte de um regime de terapia anticâncer que inclui um ou mais outros agentes anticâncer. Além disso, ou alternativamente, o tratamento de um indivíduo com câncer usando as células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos descritos neste documento pode ser usado para suplementar uma terapia anticâncer que inclui um ou mais outros agentes anticâncer. Tais agentes anticâncer são bem conhecidos na técnica e incluem agentes anti-inflamatórios, agentes imumoduladores, agentes citotóxicos, vacinas contra o câncer, quimioterápicos, inibidores de HDAC (*por exemplo*, HDAC6i (ACY-241)) e siRNAs. Agentes anticâncer específicos que podem ser administrados a um indivíduo com câncer, *por exemplo*, um indivíduo com células tumorais, além das células NK produzidas usando os métodos aqui descritos e, opcionalmente, perfusaro, células de perfusato, células exterminadoras naturais diferentes das células NK produzidas usando os métodos aqui descritos incluem, mas não estão limitados a: acivicina; aclarubicina; cloridrato de acodazol; acronina; adozelesin; adriamicina; adrucila; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; amsacrina; anastrozole; antramicina; asparaginase (*por exemplo*, de Erwinia chrysan; Erwinaze); asperlin; avastina (bevacizumabe); azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; cloridrato de bisantreno; bisnafide dimesilato; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar de sódio; bropirimina; busulfan; cactinomicina; calusterone; caracemida; carbetimer; carboplatina; carmustina; cloridrato de carubicina; carzelesin; cedefingol; celecoxib (inibidor COX-2); Cerubidina; clorambucil; cirolemicina; cisplatina; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; cloridrato de daunorrubicina; decitabina; dexormaplatina; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziquona; docetaxel; doxorrubicina; cloridrato de doxorrubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona;

duazomicina; edatrexato; cloridrato de eflomitina; elsamitrucina; Elspar; enloplatina; enpromate; epipropidina; cloridrato de epirrubicina; erbulozole; cloridrato de esorrubicina; estramustina; fosfato de estramustina sódico; etanidazol; etoposido; fosfato de etoposídeo; Etopofos; etoprina; cloridrato de fadrozole; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracila; flurocitabina; fosquidona; fostriecina de sódio; gencitabina; cloridrato de gencitabina; hidroxiureia; Idamicina; cloridrato de idarrubicina; ifosfamida; ilmofosina; iproplatina; irinotecan; cloridrato de irinotecano; acetato de lanreotida; letrozole; acetato de leuprolida; cloridrato de liarozole; lometrexol de sódio; lomustina; cloridrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; cloridrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalan; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato de sódio; metoprina; meturedepa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; cloridrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatina; oxisuran; paclitaxel; pegaspargase; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobroman; piposulfan; cloridrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero de sódio; porfiromicina; prednimustina; cloridrato de procarbazina; Proleukin; Purinethol; puromicina; cloridrato de puromicina; pirazofurina; Rheumatrex; riboprina; safingol; cloridrato de safingol; semustina; simtrazene; esparfosato de sódio; esparsomicina; cloridrato de espirogermânio; espiromustina; espiroplatina; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; Tablóide; talisomicina; tecogalan sodium; taxotere; tegafur; cloridrato de teloxantrona; temoporfina; teniposídeo; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; Toposar; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; Trexall; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; cloridrato de tubulozole; mostarda de

uracila; uredepa; vapreotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinhapidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartarato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozole; zeniplatina; zinostatina; e cloridrato de zorrubicina.

[0481] Outros fármacos anticancerígenos incluem, mas não estão limitados a: 20-epi-1,25 di-hidroxivitamina D3; 5-azacitidina; 5-etiniluracil; abiraterona; aclarubicina; acilfulveno; adecpenol; adozelesin; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelide; anastrozole; andrographolide; inibidores da angiogênese; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína-1 morfogenética anti-dorsalizante; antiandrogênio, carcinoma prostático; antiestrogênio; antineoplaston; oligonucleotídeos antissentido; glicinato de afidicolina; moduladores de genes de apoptose; reguladores de apoptose; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminase; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azassetron; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilstaurosporina; derivados de beta lactâmicos; beta-aletina; betaclamicina B; ácido betulínico; inibidor de bFGF; bicalutamida; bisantrene; bisaziridinilspermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfostina C; camptosar (também denominado Campto; irinotecano) derivados de camptotecina; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inibidor derivado da cartilagem; carzelesin; inibidores da caseína quinase (ICOS); castanospermina; CC-122; CC-220; CC-486; cecropin B; cetrorelix; chlorlns; sulfonamida de cloroquinoxalina; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4;

análogo de combretastatina; conagenina; crambescidin 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatame; cipemicina; ocfosfato de citarabina; fator citolítico; citostatina; daclximabe; decitabina; desidrodidenmina B; deslorelina; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamil; diaziquone; didemnin B; didox; dietilnorspermina; di-hidro-5-azacitidina; di-hidrotaxol, 9-; dioxamicina; difenil espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetron; doxifluridina; doxorrubicina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomabe; eflornitina; elemene; emitefur; epirrubicina; epristeride; análogo de estramustina; agonistas de estrogênio; antagonistas de estrogênio; etanidazol; fosfato de etoposídeo; exemestano; fadrozole; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina (*por exemplo*, Fludara); cloridrato de fluorodaunorunicina; forfenimex; formestano; fostriecin; fotemustina; gadolínio texafirina; nitrato de gálio; galocitabina; ganirelix; inibidores de gelatinase; gencitabina; inibidores de glutationa; hepsulfam; heregulina; bisacetamida de hexametileno; homoharringtonina (HHT, mepesuccinato de omacetaxina); hipericina; ácido ibandrônico; idarrubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imatinibe (*por exemplo*, GLEEVEC®), imiquimod; peptídeos imunoestimulantes; inibidor do receptor do fator de crescimento 1 semelhante à insulina; agonistas de interferon; interferons; interleucinas; iobenguane; iododoxorrubicina; ipomeanol, 4-; iroplact; irsogladine; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetron; jasplakinolida; kahalalide F; triacetato de lamelarina-N; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinana; leptolstatina; letrozol; fator de inibição da leucemia; interferon alfa de leucócito; leuprolida + estrogênio + progesterona; leuprorrelina; levamisol; liarozol; análogo linear de poliamina; peptídeo dissacarídeo lipofílico; compostos de platina lipofílicos; lissoclinamida

7; lobaplatina; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; loxoribina; lurtotecan; lutécio texafirina; lisofilina; péptidos líticos; maitansine; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspin; inibidores de matrilisina; inibidores de metaloproteinase de matriz; menogaril; merbarone; meterelin; metioninase; metoclopramida; inibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; mitoguazona; mitolactol; análogos da mitomicina; mitonafida; fator de crescimento de fibroblasto de mitotoxina-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticorpo anti-EGFR (*por exemplo*, Erbitux (cetuximab)); anticorpo anti-CD19; anticorpo anti-CD20 (*por exemplo*, rituximab); anticorpo anti-CS-1 (*por exemplo*, elotuzumab (BMS/AbbVie)); anticorpo anti-CD38 (*por exemplo*, daratumumabw (Genmab/Janssen Biotech); anticorpo anti-CD138 (*por exemplo*, indatuximabw (Biotest AG Dreieich)); anticorpo anti-PD-1; anticorpo anti-PD-L1 (*por exemplo*, durvalumabw (AstraZeneca)); anticorpo anti-NKG2A (*por exemplo*, monalizumabe (IPH2201; Innate Pharma)); anticorpo anti-DLL4 (por exemplo, demcizumabe (Oncomed/Celgene)); anticorpo biespecífico anti-DLL4 e anti-VEGF; anticorpo anti-RSPO3; anti Anticorpo TIGIT; anticorpo agonista de ICOS; anticorpo anti-disialogangliosídeo (GD2) (*por exemplo*, anticorpo monoclonal 3F8 ou ch14.18); anticorpo anti-ErbB2 (*por exemplo*, herceptina); gonadotrofina coriônica humana; monofosforil lipídeo A + mopidamol da parede celular; mopidamol; agente anticâncer de mostarda; micaperóxido B; extrato da parede celular micobacteriana; miriaporona; N-acetildinalina; benzamidas N-substituída; nafarelina; nagrestip; naloxona + pentazocina; napavin; naphterpin; nartograstim; nedaplatina; nemorrubicina; ácido neridrônico; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; antioxidante de nitróxido; nitrullyn; oblimersen (GENASENSE®); O^6-benzilguanina; octreotídeo; okicenona; oligonucleotídeos; onapristone; ondansetron; ondansetron; oracina; indutor de citocina oral; ormaplatina; osaterona; oxaliplatina (*por exemplo*, Floxatina);

oxaunomicina; paclitaxel; análogos do paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamine; palmitoylrhizoxin; ácido pamidrônico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargase; peldesina; pentosan polissulfato de sódio; pentostatina; pentrozol; perflubron; perfosfamida; álcool perílico; fenazinomicina; fenilacetato; inibidores de fosfatase; picibanil; cloridrato de pilocarpina; pirarubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inibidor do ativador do plasminogênio; complexo de platina; compostos de platina; complexo de platina-triamina; porfímero de sódio; porfiromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inibidores de proteassoma; modulador imunológico baseado em proteína A; inibidor da proteína quinase C; inibidores da proteína quinase C, microalgal; inibidores da proteína tirosina fosfatase; inibidores de fosforilase de nucleosídeo de purina; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de hemoglobina polioxietileno piridoxilado; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetron; inibidores da proteína ras farnesil transferase; inibidores de ras; inibidor ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de rénio Re 186; rizoxina; ribozimas; Retinamida RII; rohitukine; romurtide; roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopin; SarCNU; sarcofitol A; sargramostim; Miméticos Sdi 1; semustina; derivado de inibidor da senescência 1; oligonucleotídeos de sentido; inibidores de transdução de sinal; sizofiran; sobuzoxano; borocaptato de sódio; fenilacetato de sódio; solverol; proteína de ligação à somatomedina; sonermin; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongistatina 1; esqualamina; estipiamida; inibidores de estromelisina; sulfinosina; antagonista de peptídeo intestinal vasoativo superativo; suradista; suramina; swainsonina; talimustina; metiodeto de tamoxifeno; tauromustina; tazaroteno; tecogalan sodium; tegafur; telurapirílio; inibidores da telomerase; temoporfina; teniposídeo; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoietina; mimético de trombopoietina; timalfasina; agonista

do receptor de timopoietina; timotrinano; hormônio estimulador da tireoide; etil etiopurpurina de estanho; tirapazamina; bicloreto de titanoceno; topsentina; toremifeno; inibidores de tradução; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropissetron; turosterida; inibidores da tirosina quinase; tirfostinas; Inibidores de UBC; ubenimex; fator inibidor do crescimento derivado do seio urogenital; antagonistas do receptor da uroquinase; vapreotida; variolina B; Vectibix (panitumumab) velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltine; vitaxin; vorozole; Welcovorin (leucovorin); Xeloda (capecitabina); zanoterona; zeniplatina; zilascorb; e estimalâmero de zinostatina.

[0482] O tratamento de um indivíduo com câncer usando as células NK produzidas usando os métodos descritos neste documento, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, pode ser parte de um regime de terapia anticâncer que inclui um ou mais moduladores do ponto de controle imunológico. Em certas modalidades, o modulador de ponto de controle imunológico modula uma molécula de ponto de controle imunológico, como CD28, OX40, proteína relacionada ao receptor do fator de necrose tumoral induzida por glicocorticoide (GITR), CD137 (4-1BB), CD27, mediador de entrada do vírus herpes (HVEM), Imunoglobulina de células T e domínio de mucina contendo-3 (TIM-3), gene de ativação de linfócitos 3 (LAG-3), antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4), domínio V supressor de imunoglobulina de T ativação celular (VISTA), atenuador de linfócitos B e T (BTLA), PD-1 e/ou PD-L1. Em certas modalidades, a molécula de ponto de controle imunológico é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[0483] Em certas modalidades, o modulador de ponto de controle imunológico é um agonista de uma molécula de ponto de controle imunológico.

Em certas modalidades, a molécula de ponto de controle imunológico é CD28, OX40, proteína relacionada ao receptor do fator de necrose tumoral induzida por glicocorticoide (GITR), CD137 (4-1BB), CD27, ICOS (CD278); coestimulador de células T induzível) e/ou mediador de entrada do vírus Herpes (HVEM). Em certas modalidades, o modulador de ponto de controle imunológico é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[0484] Em certas modalidades, o modulador de ponto de controle imunológico é um antagonista de uma molécula de ponto de controle imunológico. Em certas modalidades, a molécula de ponto de controle imunológico é imunoglobulina de células T e domínio de mucina contendo-3 (TIM-3), Gene de ativação de linfócitos 3 (LAG-3), Antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4), Supressor de imunoglobulina de ativação de células T de domínio V (VISTA), Atenuador de linfócitos B e T (BTLA), PD-1 e/ou PD-L1. Em certas modalidades, o modulador de ponto de controle imunológico é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[0485] Em certas modalidades, o modulador de ponto de controle imunológico é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo se liga a PD-1. Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo que se liga a PD-1 é nivolumabe (OPDIVO® BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538; Bristol-Myers Squibb, Ono Pharmaceuticals, Inc.), pembrolizumabe (KEYTRUDA®, lambrolizumabe, MK-3475; Merck), pidilizumabe (CT-011; Curetech, Medivation); MEDI0680 (AMP-514; MedImmune, AstraZeneca); PDR-001 (Novartis), SHR1210 ou INCSHR1210; Incyte, Jiangsu Hengrui). Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga a PD-L1. Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga a PD-L1 é

durvalumabe (MEDI4736; MedImmune, AstraZeneca), BMS-936559 (MDX-1105; Bristol-Myers Squibb), avelumabe (MSB0010718C; Merck Serono, Pfizer), ou atezolizumabe (MPDL-3280A; Genentech, Roche). Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo se liga a LAG-3. Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo que se liga a LAG-3 é BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb), GSK2831781 (GlaxoSmithKline) ou LAG525 (Novartis). Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo se liga a CTLA-4. Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo que se liga a CTLA-4 é ipilimumabe (YERVOY ™, BMS-734016, MDX010, MDX-101; Bristol-Myers Squibb) ou tremelimumabe (CP-675,206; MedImmune, AstraZeneca). Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo se liga a OX40. Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo que se liga a OX40 é MEDI6469 (MedImmune, AstraZeneca), MEDI0562 (MedImmune, AstraZeneca) ou KHK4083 (Kyowa Hakko Kirin). Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo se liga a GITR. Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo que se liga a GITR é TRX518 (Leap Therapeutics) ou MEDI1873 (MedImmune, AstraZeneca). Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo se liga a CD137 (4-1BB). Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo que se liga a CD137 (4-1BB) é PF-2566 (PF-05082566; Pfizer) ou urelumabe (BMS-663513; Bristol-Myers Squibb). Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo se liga a CD27. Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo que se liga ao CD27 é varilumabe (CDX-1127; Celldex Therapies).

[0486] Em certas modalidades, o tratamento de um indivíduo com câncer usando as células NK produzidas usando os métodos descritos neste documento, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, é parte de um regime de terapia anticâncer que inclui lenalidomida ou pomalidomida. Em certas modalidades, o tratamento de um indivíduo com câncer usando as células NK produzidas usando os métodos descritos neste documento, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, faz parte de um regime de terapia anticâncer que inclui um inibidor de HDAC. Em certas modalidades, o tratamento de um indivíduo com câncer usando as células NK produzidas usando os métodos descritos neste documento, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, é parte de um regime de terapia anticâncer que inclui anticorpo anti-CS-1. Em certas modalidades, o tratamento de um indivíduo com câncer usando as células NK produzidas usando os métodos descritos neste documento, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, faz parte de um regime de terapia anticâncer que inclui um anticorpo anti-CD38. Em certas modalidades, o tratamento de um indivíduo com câncer usando as células NK produzidas usando os métodos descritos neste documento, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, é parte de um regime de terapia anticâncer que inclui anticorpo anti-CD138. Em certas modalidades, o tratamento de um indivíduo com câncer usando as células NK produzidas usando os métodos descritos neste documento, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, é parte de um regime de terapia anticâncer que inclui anticorpo anti-PD-1. Em certas modalidades, o tratamento de um indivíduo com câncer usando as células NK produzidas usando os métodos

descritos neste documento, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, faz parte de um regime de terapia anticâncer que inclui um anticorpo anti-PD-L1. Em certas modalidades, o tratamento de um indivíduo com câncer usando as células NK produzidas usando os métodos descritos neste documento, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, faz parte de um regime de terapia anticâncer que inclui um anticorpo anti-NKG2A. Em certas modalidades, o tratamento de um indivíduo com câncer usando as células NK produzidas usando os métodos aqui descritos, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, faz parte de um regime de terapia anticâncer que inclui um anticorpo anti-CD20 (*por exemplo*, rituximabe; RITUXAN®). Em certas modalidades, o tratamento de um indivíduo com câncer usando as células NK produzidas usando os métodos descritos neste documento, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, faz parte de um regime de terapia anticâncer que inclui CC-122. Em certas modalidades, o tratamento de um indivíduo com câncer usando as células NK produzidas usando os métodos descritos neste documento, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, é parte de um regime de terapia anticâncer que inclui CC-220. Em certas modalidades, o tratamento de um indivíduo com câncer usando as células NK produzidas usando os métodos descritos neste documento, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, faz parte de um regime de terapia anticâncer que inclui um anticorpo anti-DLL4 (*por exemplo*, demcizumabe). Em certas modalidades, o tratamento de um indivíduo com câncer usando as células NK produzidas usando os métodos descritos neste documento, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o

método de três estágios aqui descrito, faz parte de um regime de terapia anticâncer que inclui um anticorpo biespecífico anti-DLL4 e anti-VEGF. Em certas modalidades, o tratamento de um indivíduo com câncer usando as células NK produzidas usando os métodos descritos neste documento, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, faz parte de um regime de terapia anticâncer que inclui um anticorpo anti-RSPO3. Em certas modalidades, o tratamento de um indivíduo com câncer usando as células NK produzidas usando os métodos descritos neste documento, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, faz parte de um regime de terapia anticâncer que inclui um anticorpo anti-TIGIT. Em certas modalidades, o tratamento de um indivíduo com câncer usando as células NK produzidas usando os métodos descritos neste documento, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, faz parte de um regime de terapia anticâncer que inclui um anticorpo agonista de ICOS. Em certas modalidades, o tratamento de um indivíduo com câncer usando as células NK produzidas usando os métodos descritos neste documento, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, é parte de um regime de terapia anticâncer que inclui homoharringtonina (*por exemplo*, mepesuccinato de omacetaxina).

[0487] Em algumas modalidades, o tratamento de um indivíduo com câncer usando as células NK produzidas usando os métodos aqui descritos é parte de um regime de terapia anticâncer para citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC). Em algumas modalidades, o tratamento de um indivíduo com câncer usando as células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos é parte de um regime de terapia anticâncer para citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC). Em uma modalidade, o

regime ADCC compreende a administração de um ou mais anticorpos (*por exemplo*, um anticorpo descrito no parágrafo anterior) em combinação com células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos. Vários tipos de câncer podem ser tratados usando tais métodos ADCC, incluindo, mas não se limitando a, leucemia linfoblástica aguda (ALL) ou outras malignidades de células B (linfomas e leucemias), neuroblastoma, melanoma, câncer de mama e câncer de cabeça e pescoço. Em modalidades específicas, a terapia ADCC compreende a administração de um ou mais dos seguintes anticorpos, anticorpo anti-EGFR (*por exemplo*, Erbitux (cetuximabe)), anticorpo anti-CD19, anticorpo anti-CD20 (*por exemplo*, rituximabe), antidisialogangliosídeo (GD2) anticorpo (*por exemplo*, anticorpo monoclonal 3F8 ou ch14.18), ou anticorpo anti-ErbB2 (*por exemplo*, herceptina), em combinação com células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos. Em uma modalidade, o regime ADCC compreende a administração de um anticorpo anti-CD33 em combinação com células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos. Em uma modalidade, o regime ADCC compreende a administração de um anticorpo anti-CD20 em combinação com células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos. Em uma modalidade, o regime ADCC compreende a administração de um anticorpo anti-CD138 em combinação com células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos. Em uma modalidade, o regime ADCC compreende a administração de um anticorpo anti-CD32 em combinação com células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos.

5.11.4. Tratamento de Infecção Viral

[0488] Em outra modalidade, é fornecido aqui um método de tratamento de um indivíduo com uma infecção viral, compreendendo a administração ao referido indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de células NK

produzidas usando os métodos aqui descritos, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios aqui descrito. Em outra modalidade, é fornecido aqui um método de tratamento de um indivíduo com uma infecção viral, compreendendo a administração ao referido indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos, *por exemplo*, populações de células ILC3 produzidas usando o método de três estágios aqui descrito. Em certas modalidades, o indivíduo tem uma deficiência de células exterminadoras naturais, *por exemplo*, uma deficiência de células NK ou outras células linfoides inatas ativas contra a infecção viral do indivíduo. Em certas modalidades específicas, a referida administração compreende adicionalmente a administração ao indivíduo de um ou mais de perfusato placentário isolado, células de perfusato placentário isoladas, células exterminadoras naturais isoladas, *por exemplo*, células exterminadoras naturais da placenta, *por exemplo*, células exterminadoras naturais intermediárias derivadas da placenta, isoladas combinadas células exterminadoras naturais e/ou combinações das mesmas. Em certas modalidades específicas, as células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos descritos neste documento são colocadas em contato ou colocadas em proximidade com um composto imunomodulador, *por exemplo*, um composto imunomodulador acima, ou talidomida, antes da referida administração. Em certas outras modalidades específicas, a referida administração compreende a administração de um composto imunomodulador, *por exemplo*, um composto imunomodulador descrito acima, ou talidomida, ao referido indivíduo, além das referidas células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos descritos neste documento, em que a referida quantidade é uma quantidade que, *por exemplo*, resulta em uma melhora detectável, diminuição da progressão ou eliminação de um ou mais sintomas da referida infecção viral. Em modalidades

específicas, a infecção viral é uma infecção por um vírus dos Adenoviridae, Picornaviridae, Herpesviridae, Hepadnaviridae, Flaviviridae, Retroviridae, Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Papilommaviridae, família Rhabdoviridae ou Togaviridae. Em modalidades mais específicas, o referido vírus é o vírus da imunodeficiência humana (HIV).coxsackievírus, vírus da hepatite A (HAV), poliovírus, vírus Epstein-Barr (EBV), herpes simplex tipo 1 (HSV1), herpes simplex tipo 2 (HSV2), citomegalovírus humano (CMV), herpesvírus humano tipo 8 (HHV8), vírus herpes zoster (vírus varicela zoster (VZV) ou vírus da zona), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite D (HDV), vírus da hepatite E (HEV), vírus da influenza (*por exemplo*, vírus da influenza A, vírus da influenza B, vírus da influenza C ou thogotovírus), vírus do sarampo, vírus da caxumba, vírus da parainfluenza, papilomavírus, vírus da raiva ou vírus da rubéola.

[0489] Em outras modalidades mais específicas, o referido vírus é adenovírus da espécie A, sorotipo 12, 18 ou 31; adenovírus espécie B, sorotipo 3, 7, 11, 14, 16, 34, 35 ou 50; adenovírus espécie C, sorotipo 1, 2, 5 ou 6; espécie D, sorotipo 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 51; espécie E, sorotipo 4; ou espécie F, sorotipo 40 ou 41.

[0490] Em certas outras modalidades mais específicas, o vírus é o vírus Apoi (APOIV), vírus Aroa (AROAV), vírus bagaza (BAGV), vírus Banzi (BANV), vírus Bouboui (BOUV), vírus Cacipacore (CPCV), vírus Carey Island (CIV), vírus Cowbone Ridge (CRV), vírus Dengue (DENV), vírus Edge Hill (EHV), vírus Gadgets Gully (GGYV), vírus Ilheus (ILHV), vírus da meningoencefalomielite de peru de Israel (ITV), vírus da encefalite japonesa (JEV), Vírus Jugra (JUGV), vírus Jutiapa (JUTV), vírus kadam (KADV), vírus Kedougou (KEDV), vírus Kokobera (KOKV), vírus Koutango (KOUV), vírus da doença da floresta Kyasanur (KFDV), vírus Langat

(LGTV), Vírus Meaban (MEAV), vírus Modoc (MODV), vírus da leucoencefalite Montana myotis (MMLV), vírus da encefalite Murray Valley (MVEV), vírus Ntaya (NTAV), vírus da febre hemorrágica Omsk (OHFV), vírus Powassan (POWV), Rio Vírus Bravo (RBV), vírus Royal Farm (RFV), vírus Saboya (SABV), vírus da encefalite de St. Louis (SLEV), vírus Sal Vieja (SVV), vírus San Perlita (SPV), vírus Saumarez Reef (SREV), Se vírus pik (SEPV), vírus Tembusu (TMUV), vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV), vírus Tyuleniy (TYUV), vírus Uganda S (UGSV), vírus Usutu (USUV), vírus Wesselsbron (WESSV), vírus do Nilo Ocidental (WNV), vírus Yaounde (YAOV), vírus da febre amarela (YFV), vírus Yokose (YOKV) ou vírus Zika (ZIKV).

[0491] Em outras modalidades, as células NK produzidas usando os métodos descritos neste documento e, opcionalmente, perfusato placentário e/ou células do perfusato, são administradas a um indivíduo com uma infecção viral como parte de um regime de terapia antiviral que inclui um ou mais outros agentes antivirais. Os agentes antivirais específicos que podem ser administrados a um indivíduo com infecção viral incluem, mas não estão limitados a: imiquimod, podofilox, podofilina, interferon alfa (IFNα), reticolos, nonoxinol-9, aciclovir, famciclovir, valaciclovir, ganciclovir, cidofovir; amantadina, rimantadina; ribavirina; zanamavir e oseltaumavir; inibidores da protease, tais como indinavir, nelfinavir, ritonavir ou saquinavir; inibidores da transcriptase reversa de nucleosídeos, tais como didanosina, lamivudina, estavudina, zalcitabina ou zidovudina; e inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos, tais como nevirapina ou efavirenz.

5.11.5. Outros Usos de Tratamento para Células ILC3

[0492] São fornecidas aqui células ILC3 que podem ser usadas em todos os métodos aqui fornecidos. Métodos exemplificativos nos quais as células ILC3 podem ser usadas são divulgados nos seguintes aspectos.

[0493] Em outro aspecto, é fornecido aqui um método de reparação do trato gastrointestinal após a quimioterapia, compreendendo a administração a um indivíduo de uma pluralidade de células ILC3, em que as células ILC3 são por um método de três estágios aqui descrito.

[0494] Em outro aspecto, é fornecido aqui um método de proteção de um indivíduo contra a radiação, compreendendo a administração a um indivíduo de uma pluralidade de células ILC3, em que as células ILC3 são produzidas por um método de três estágios aqui descrito. Em certos aspectos, as referidas células ILC3 são usadas como um adjuvante para o transplante de medula óssea.

[0495] Em outro aspecto, é fornecido aqui um método de reconstituição do timo de um indivíduo compreendendo a administração a um indivíduo de uma pluralidade de células ILC3, em que as células ILC3 são produzidas por um método de três estágios aqui descrito.

[0496] Em outro aspecto, é fornecido aqui um método de promoção da imunidade protetora a patógenos em um indivíduo compreendendo a administração a um indivíduo de uma pluralidade de células ILC3, em que as células ILC3 são produzidas por um método de três estágios aqui descrito. Em certos aspectos, a promoção da imunidade protetora aos patógenos é realizada para tratar a infecção intestinal. Em certos aspectos, a promoção da imunidade protetora aos patógenos é realizada para prevenir a infecção intestinal. Em certos aspectos, a infecção intestinal é por *Citrobacter rodentium*.

[0497] Em outro aspecto, é fornecido aqui um método de rejeição do tumor compreendendo a administração a um indivíduo de uma pluralidade de células ILC3, em que as células ILC3 foram produzidas por um método de três estágios aqui descrito.

[0498] Em outro aspecto, é fornecido aqui um método para manter a integridade do tecido durante a organogênese, compreendendo a administração

a um indivíduo de uma pluralidade de células ILC3, em que as células ILC3 foram produzidas por um método de três estágios aqui descrito.

[0499] Em outro aspecto, é fornecido aqui um método de reparo do tecido compreendendo a administração a um indivíduo de uma pluralidade de células ILC3, em que as células ILC3 foram produzidas por um método de três estágios aqui descrito.

[0500] Em outro aspecto, é fornecido aqui um método de regulação da inflamação compreendendo a administração a um indivíduo de uma pluralidade de células ILC3, em que as células ILC3 foram produzidas por um método de três estágios aqui descrito.

5.11.6. Administração

[0501] Determinação do número de células, *por exemplo*, células de perfusato placentário, *por exemplo*, células nucleadas de perfusato placentário, células exterminadoras naturais combinadas, células ILC3 e/ou células exterminadoras naturais isoladas, *por exemplo*, populações de células NK produzidas usando o método de três estágios descrito aqui, e a determinação da quantidade de um composto imunomodulador, *por exemplo*, um composto imunomodulador ou talidomida, pode ser realizada independentemente um do outro.

[0502] A administração de uma população isolada de células NK e/ou células ILC3 ou uma composição farmacêutica das mesmas pode ser sistêmica ou local. Em modalidades específicas, a administração é parenteral. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células NK e/ou células ILC3 ou uma composição farmacêutica da mesma a um sujeito é por injeção, infusão, administração intravenosa (IV), administração intrafemoral ou administração intratumoral. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células NK e/ou células ILC3 ou uma composição

farmacêutica das mesmas a um sujeito é realizada com um dispositivo, uma matriz ou um suporte. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células NK e/ou células ILC3 ou uma composição farmacêutica das mesmas a um sujeito é por injeção. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células NK e/ou células ILC3 ou uma composição farmacêutica das mesmas a um sujeito é por meio de um cateter. Em modalidades específicas, a injeção de células NK e/ou células ILC3 é uma injeção local. Em modalidades mais específicas, a injeção local é diretamente em um tumor sólido (*por exemplo*, um sarcoma). Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células NK e/ou células ILC3 ou uma composição farmacêutica das mesmas a um sujeito é por injeção por seringa. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células NK e/ou células ILC3 ou uma composição farmacêutica das mesmas a um sujeito é por meio de uma administração guiada. Em modalidades específicas, a administração de uma população isolada de células NK e/ou células ILC3 ou uma composição farmacêutica da mesma a um sujeito por injeção é auxiliada por laparoscopia, endoscopia, ultrassom, tomografia computadorizada, ressonância magnética ou radiologia.

5.11.6.1. Administração de Células

[0503] Em certas modalidades, células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos, *por exemplo*, células NK e/ou populações de células ILC3 produzidas usando o método de três estágios aqui descrito, são usadas, *por exemplo*, administradas a um indivíduo, em qualquer quantidade ou número que resulta em um benefício terapêutico detectável para o indivíduo, *por exemplo*, uma quantidade eficaz, em que o indivíduo tem uma infecção viral, câncer ou células tumorais, por exemplo, um indivíduo com células tumorais, um tumor sólido ou um câncer no sangue, *por exemplo*, um paciente com câncer.

Tais células podem ser administradas a tal indivíduo por números absolutos de células, *por exemplo*, o referido indivíduo pode ser administrado em cerca de, pelo menos cerca de, ou no máximo cerca de 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, ou 1×10^{11} células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos. Em outras modalidades, as células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos descritos neste documento podem ser administradas a esse indivíduo por números relativos de células, *por exemplo*, o referido indivíduo pode ser administrado em cerca de, pelo menos cerca de, ou no máximo cerca de, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, ou 1×10^{11} células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos por quilograma do indivíduo. Em outras modalidades, as células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos descritos neste documento podem ser administradas a tal indivíduo por números relativos de células, *por exemplo*, o referido indivíduo pode ser administrado em cerca de, pelo menos cerca de, ou no máximo cerca de, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, ou 5×10^8 células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos por quilograma do indivíduo. As células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos descritos neste documento podem ser administradas a tal indivíduo de acordo com uma razão aproximada entre uma série de células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos descritos neste documento e, opcionalmente, células de perfusato placentário e/ou células exterminadoras naturais diferentes das células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos, e um número de células tumorais no referido indivíduo (*por exemplo*, um número estimado). Por exemplo, células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos podem ser administradas ao referido indivíduo em uma razão de cerca de, pelo menos cerca

ou no máximo cerca de 1:1, 1:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, 95:1 ou 100:1 para o número de células tumorais no indivíduo. O número de células tumorais em tal indivíduo pode ser estimado, *por exemplo*, contando o número de células tumorais em uma amostra de tecido do indivíduo, *por exemplo*, amostra de sangue, biópsia ou semelhantes. Em modalidades específicas, *por exemplo*, para tumores sólidos, a referida contagem é realizada em combinação com a imagem do tumor ou tumores para obter um volume aproximado do tumor. Em uma modalidade específica, um composto imunomodulador ou talidomida, *por exemplo*, uma quantidade eficaz de um composto imunomodulador ou talidomida, são administrados ao indivíduo além das células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos, opcionalmente células de perfusato placentário e/ou células exterminadoras naturais diferentes das células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos.

[0504] Em certas modalidades, o método de suprimir a proliferação de células tumorais, *por exemplo*, em um indivíduo; tratamento de um indivíduo com deficiência nas células exterminadoras naturais do indivíduo; ou tratamento de um indivíduo com infecção viral; ou o tratamento de um indivíduo com câncer, *por exemplo*, um indivíduo com células tumorais, um câncer no sangue ou um tumor sólido, compreende trazer as células tumorais para a proximidade com, ou administrar ao referido indivíduo, uma combinação de células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos e uma ou mais perfusato placentário e/ou células de perfusato placentário. Em modalidades específicas, o método compreende adicionalmente trazer as células tumorais em proximidade com, ou administrar ao indivíduo, um composto imunomodulador ou talidomida.

[0505] Em uma modalidade específica, por exemplo, o tratamento de um indivíduo com uma deficiência nas células exterminadoras naturais do indivíduo (*por exemplo*, uma deficiência no número de células NK ou na reatividade das células NK a um câncer, tumor ou células infectadas por vírus); ou o tratamento de um indivíduo com câncer ou infecção viral, ou supressão da proliferação de células tumorais, compreende trazer as referidas células tumorais em proximidade com, ou administrar ao referido indivíduo, células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos descritos neste documento suplementados com células isoladas do perfusato placentário ou do perfusato placentário. Em modalidades específicas, cerca de 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8 ou mais células NK produzidas usando os métodos aqui descritos por mililitro, ou 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11} ou mais células NK produzidas usando os métodos aqui descritos são suplementados com cerca de, ou pelo menos cerca de 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8 ou mais células de perfusato placentário isoladas por mililitro, ou 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11} ou mais células de perfusato placentário isoladas. Em outras modalidades mais específicas, cerca de 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8 ou mais células NK produzido usando os métodos aqui descritos ou 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11} ou mais células NK produzidas usando os métodos aqui descritos são suplementados com cerca de, ou pelo menos cerca de, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 ou 1.000 mL de perfusato, ou cerca de 1 unidade de

perfusato.

[0506] Em outra modalidade específica, o tratamento de um indivíduo com deficiência nas células exterminadoras naturais do indivíduo; tratamento de um indivíduo com câncer; tratamento de um indivíduo com infecção viral; ou supressão da proliferação de células tumorais, compreende trazer as células tumorais para a proximidade com, ou administrar ao indivíduo, células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos, em que as referidas células são suplementadas com células placentárias aderentes, *por exemplo*, células-tronco placentárias aderentes ou células multipotentes, *por exemplo*, células placentárias aderentes a plástico de cultura de tecido $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$. Em modalidades específicas, as células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos são suplementadas com cerca de 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8 u mais células-tronco placentárias aderentes por mililitro, ou 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11} ou mais células da placenta aderentes, *por exemplo*, células-tronco placentárias aderentes ou células multipotentes.

[0507] Em outra modalidade específica, o tratamento de um indivíduo com deficiência nas células exterminadoras naturais do indivíduo; tratamento de um indivíduo com câncer; tratamento de um indivíduo com infecção viral; ou supressão da proliferação de células tumorais, é realizada usando um composto imunomodulador ou talidomida em combinação com células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos, em que as referidas células são suplementadas com meio condicionado, por *exemplo*, meio condicionado por $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ células placentárias aderentes a plástico de cultura de tecidos, *por exemplo*, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,1, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mL de meio de cultura condicionado com células-tronco por

unidade de perfusato, ou por 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, or 10^{11} células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos. Em certas modalidades, as células placentárias aderentes ao plástico de cultura de tecidos são as células da placenta aderentes multipotentes descritas nas Patentes U.S. Nos. 7.468.276 e 8.057.788, cujas divulgações estão incorporadas neste documento por referência em sua totalidade. Em outras modalidades específicas, o método compreende adicionalmente trazer as células tumorais em proximidade com, ou administrar ao indivíduo, um composto imunomodulador ou talidomida.

[0508] Em outra modalidade específica, o tratamento de um indivíduo com deficiência nas células exterminadoras naturais do indivíduo; tratamento de um indivíduo com câncer; tratamento de um indivíduo com infecção viral; ou supressão da proliferação de células tumorais, em que as referidas células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos são suplementadas com células de perfusato placentário, as células de perfusato são colocadas em proximidade com a interleucina-2 (IL-2) por um período de tempo antes da referida aproximação. Em certas modalidades, o referido período de tempo é de cerca de, pelo menos, ou no máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 ou 48 horas antes da referida aproximação.

[0509] As células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos e, opcionalmente, perfusato ou células de perfusato, podem ser administradas uma vez a um indivíduo com uma infecção viral, um indivíduo com câncer ou um indivíduo com células tumorais, durante um curso de anticâncer terapia; ou pode ser administrado várias vezes, *por exemplo*, uma vez a cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ou 23 horas, ou uma vez a cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dias, ou uma vez a cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,

8, 9, 10, 24, 36 ou mais semanas durante a terapia. Em modalidades nas quais células e um composto imunomodulador ou talidomida são usados, o composto imunomodulador ou talidomida, e células ou perfusato, podem ser administrados ao indivíduo juntos, *por exemplo*, na mesma formulação; separadamente, *por exemplo*, em formulações separadas, aproximadamente ao mesmo tempo; ou pode ser administrado separadamente, *por exemplo*, em diferentes esquemas de dosagem ou em diferentes momentos do dia. Da mesma forma, em modalidades nas quais células e um composto antiviral ou composto anticâncer são usados, o composto antiviral ou composto anticâncer e células ou perfusato podem ser administrados ao indivíduo juntos, *por exemplo*, na mesma formulação; separadamente, *por exemplo*, em formulações separadas, aproximadamente ao mesmo tempo; ou pode ser administrado separadamente, *por exemplo*, em diferentes esquemas de dosagem ou em diferentes momentos do dia. As células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos e células de perfusato ou perfusato podem ser administradas independentemente das células NK e/ou células ILC3 produzidas usando os métodos aqui descritos, células de perfusato ou perfusato foram administradas ao indivíduo no passado.

6. **KITS**

[0510] É fornecido aqui um pacote ou kit farmacêutico compreendendo um ou mais recipientes preenchidos com uma ou mais das composições aqui descritas, *por exemplo*, uma composição compreendendo células NK e/ou células ILC3 produzidas por um método aqui descrito, *por exemplo*, populações de célula NK e/ou células ILC3 produzidas usando o método de três estágios aqui descrito. Opcionalmente, associado a tais recipientes pode haver um aviso na forma prescrita por uma agência governamental que regulamenta a fabricação, uso ou venda de produtos farmacêuticos ou biológicos, cujo aviso reflete a

aprovação da agência de fabricação, uso ou venda para administração humana.

[0511] Os kits aqui abrangidos podem ser usados de acordo com os métodos descritos neste documento, *por exemplo*, métodos de suprimir o crescimento de células tumorais e/ou métodos de tratamento de câncer, *por exemplo*, câncer hematológico e/ou métodos de tratamento de infecção viral. Em uma modalidade, um kit compreende células NK e/ou células ILC3 produzidas por um método aqui descrito ou uma composição dos mesmos, em um ou mais recipientes. Em uma modalidade específica, é fornecido neste documento um kit que compreende uma população de células NK e/ou células ILC3 produzida por um método de três estágios aqui descrito, ou uma composição do mesmo.

7. EXEMPLOS

7.1. Exemplo 1: Método de três estágios de produção de células exterminadoras naturais a partir de células-tronco hematopoéticas ou células progenitoras

[0512] As células $CD34^+$ são cultivadas nas seguintes formulações de meio durante o número de dias indicado, e alíquotas de células são retiradas para avaliação da contagem de células, viabilidade celular, caracterização da diferenciação de células exterminadoras naturais e avaliação funcional.

[0513] Meio de estágio 1: 90% de meio de crescimento de células-tronco (SCGM) (CellGro®), 10% de soro humano-AB, suplementado com 25 ng/mL ou 250 ng/mL de trombopoietina humana recombinante (TPO), 25 ng/mL de Flt3L humano recombinante, 27 ng/mL de fator de célula-tronco humana recombinante (SCF), 25 ng/mL de IL-7 humana recombinante, 0,05 ng/mL ou 0,025 ng/mL de IL-6 humana recombinante, 0,25 ng/mL ou 0,125 ng/mL de fator de estimulação de colônia de granulócitos humano recombinante (G-CSF), fator de estimulação de colônia de granulócitos-macrófagos humanos recombinante 0,01 ng/mL ou 0,025 ng/mL (GM-CSF), 0,10% de gentamicina e 1 a 10 µm de

StemRegenin-1 (SR-1) ou outro agente de mobilização de células-tronco.

[0514] Meio de estágio 2: 90% de SCGM, 10% de soro humano-AB, suplementado com 25 ng/mL de Flt3L humano recombinante, 27 ng/mL de SCF humano recombinante, 25 ng/mL de IL-7 humana recombinante, 20 ng/mL de IL humana recombinante -15, 0,05 ng/mL ou 0,025 ng/mL de IL-6 humana recombinante, 0,25 ng/mL ou 0,125 ng/mL de fator estimulador de colônia de granulócitos humanos recombinantes (G-CSF), 0,01 ng/mL ou 0,025 ng/mL fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos recombinante humanos (GM-CSF), 0,10% de gentamicina e 1 a 10 µm SR1 ou outro agente de mobilização de células-tronco.

[0515] Meio de estágio 3: 90% de STEMMACS™, 10% de Soro-AB humano, 0,025 mM de 2-mercaptoetanol (55 mM), suplementado com 22 ng/mL de SCF humano recombinante, 1.000 U/mL de IL-2 humana recombinante, 20 ng/mL de IL-7 humana recombinante, 20 ng/mL de IL-15 humana recombinante, 0,05 ng/mL ou 0,025 ng/mL de IL-6 humana recombinante, 0,25 ng/mL ou 0,125 ng/mL de fator estimulador de colônia de granulócitos humanos recombinantes (G-CSF), 0,01 ng/mL ou 0,025 ng/mL de fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos humanos recombinantes (GM-CSF) e 0,10% de gentamicina.

[0516] As células são semeadas no Dia 0 a 3×10^4células/mL no meio do Estágio 1, e as células são testadas quanto à pureza por uma contagem de CD34 + e CD45 + e viabilidade por coloração 7AAD. No Dia 5, as células são contadas e semeadas a uma concentração de 1×10^5 células/mL com meio de Estágio 1. No Dia 7, as células são contadas e semeadas a uma concentração de 1×10^5 células/mL com meio de Estágio 1.

[0517] No Dia 10, as células são contadas e semeadas a uma concentração de 1×10^5 células/mL com meio de Estágio 2. No Dia 12, as células são contadas

e semeadas a uma concentração de 3×10^5 células/mL no meio do Estágio 2. No Dia 14, as células são contadas e semeadas no meio do Estágio 3. As células são mantidas em meio do Estágio 3 até o dia 35.

[0518] Alternativamente, o seguinte protocolo é usado ao longo do Dia 14: Células semeadas no Dia 0 em $7,5 \times 10^3$ células/mL nos meios do Estágio 1 e as células são testadas quanto à pureza por uma contagem de CD34 + e CD45 + e viabilidade por coloração 7AAD. No Dia 7, as células são contadas e semeadas a uma concentração de 3×10^5 células/mL com meio de Estágio 1. No Dia 9, as células são contadas e semeadas a uma concentração de 3×10^5 células/mL com meio do Estágio 2. No Dia 12, as células são contadas e semeadas a uma concentração de 3×10^5 células/mL no meio do Estágio 2. No Dia 14, as células são contadas e semeadas a uma concentração de $3 \times 10^{5\ \text{células}}$/mL no meio do Estágio 2.

[0519] A semeadura das células na passagem é realizada por diluição da cultura com meio fresco ou por centrifugação das células e ressuspensão/adição de meio fresco.

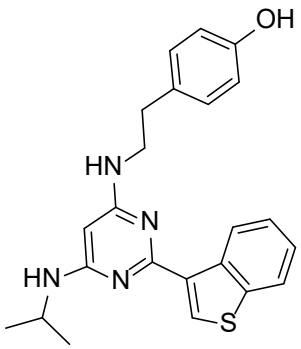
[0520] Para a colheita, as células são centrifugadas a 400 ×*g* por sete minutos, seguido pela suspensão do precipitado em um volume igual de Plasmalyte A. A suspensão é centrifugada a 400 ×*g* por sete minutos, e o precipiutado resultante é suspenso em 10% de HSA (p/v), 60% de Plasmalyte A (v/v) na concentração de células alvo. As células são então filtradas através de uma malha de 70 µm, o recipiente final é preenchido, uma alíquota das células é testada quanto à viabilidade, citotoxicidade, pureza e contagem de células, e o restante é embalado.

7.2. Exemplo 2: Seleção de agentes de mobilização de células-tronco para a expansão de células NK

[0521] Os seguintes compostos foram investigados por sua capacidade de

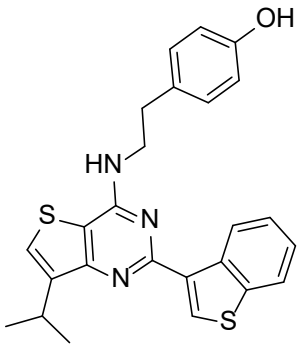
promover a expansão das populações de células NK in vitro:

4-(2-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-6-(isopropilamino)pirimidin-4-il)amino)etil)fenol) (“CRL1”)



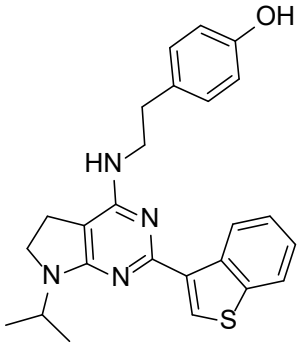
;

4-(2-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-7-isopropiltieno[3,2-*d]*pirimidin-4-il)amino)etil)fenol)) (“CRL2”)



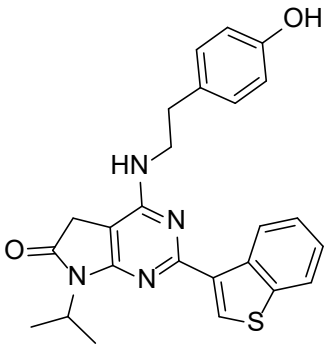
;

4-(2-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-7-isopropil-6,7-di-hidro-5H-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino)etil)fenol (“CRL3”)



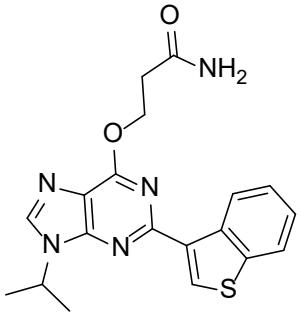
;

2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-4-((4-hidroxifenetil)amino)-7-isopropil-5,7-di-hidro-6*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-6-ona (“CRL4”)



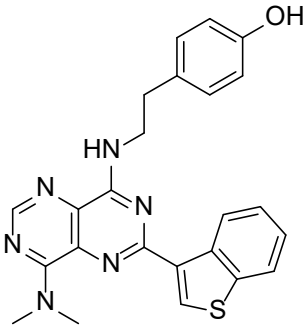
;

3-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-9-isopropil-9*H*-purin-6-il)óxi)propanamida ("CRL5")



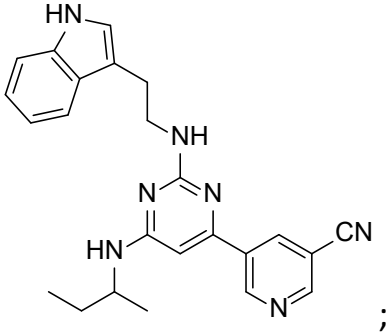
;

4-(2-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-8-(dimetilamino)pirimido[5,4-*d*]pirimidin-4-il)amino)etil)fenol ("CRL6")



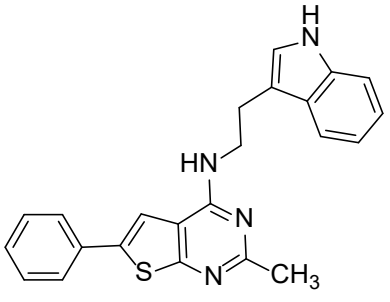
;

5-(2-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)-6-(*sec*-butilamino)pirimidin-4-il)nicotinonitrila ("CRL7")



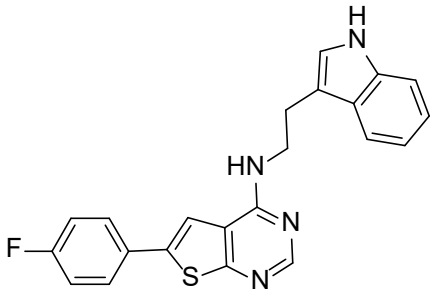
;

N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-metil-6-feniltieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (“CRL8”)



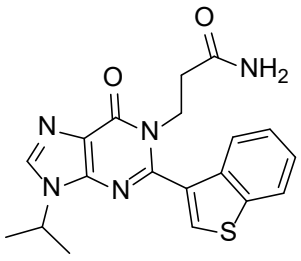
;

N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (“CRL9”)



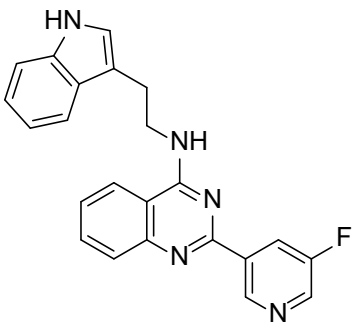
;

3-(2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-9-isopropil-6-oxo-6,9-di-hidro-1*H*-purin-1-il)propanamida (“CRL10”)



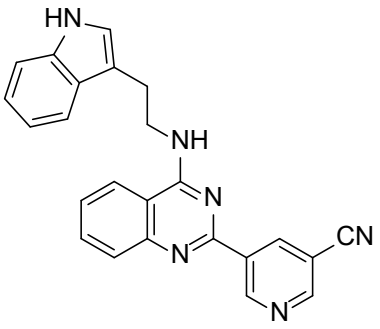
;

N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-fluoropiridin-3-il)quinazolin-4-amina (“CRL11”)



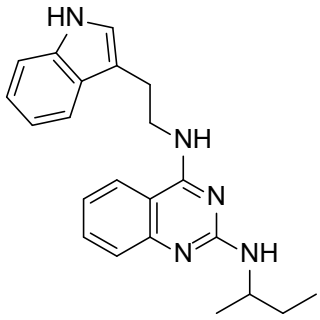
;

5-(4-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)quinazolin-2-il)nicotinonitrila (“CRL12”)



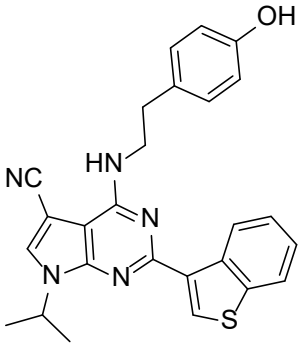
;

N^4-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-N^2-(*sec*-butil)quinazolina-2,4-diamina (“CRL13”)



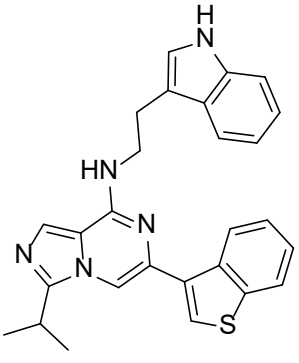
;

2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-4-((4-hidroxifenetil)amino)-7-isopropil-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina-5-carbonitrila (“CRL14”)



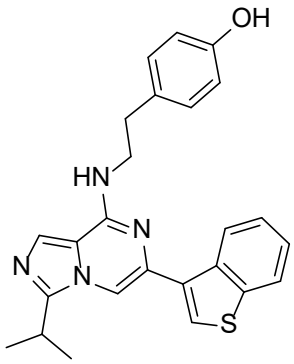
;

N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-6-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-3-isopropilimidazo[1,5-*a*]pirazin-8-amina (“CRL15”)



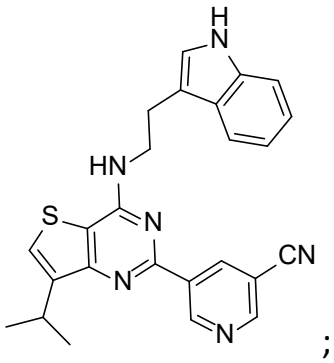
;

4-(2-((6-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-3-isopropilimidazo[1,5-*a*]pirazin-8-il)amino)etil)fenol (“CRL16”)



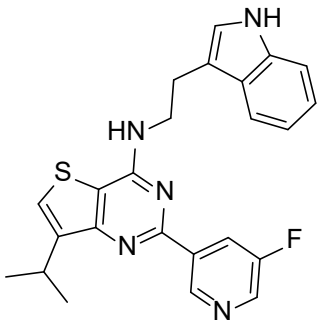
;

5-(4-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)-7-isopropiltieno[3,2-*d]*pirimidin-2-il)nicotinonitrila (“CRL17”)



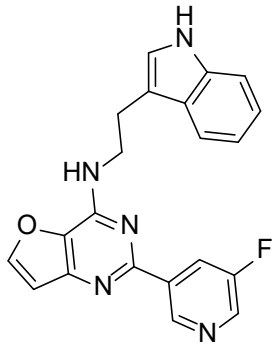
;

N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-7-isopropiltieno[3,2-*d*]pirimidin-4-amina (“CRL18”)



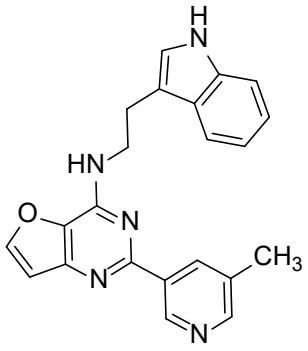
;

N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-fluoropiridin-3-il)furo[3,2-*d*]pirimidin-4-amina (“CRL19”)



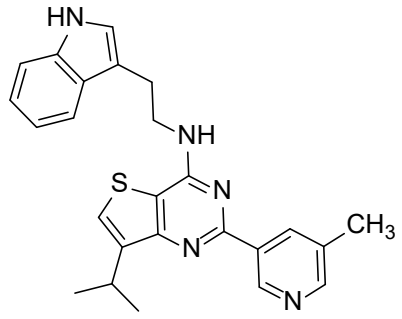
;

N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-metilpiridin-3-il)furo[3,2-*d*]pirimidin-4-amina (“CRL20”)



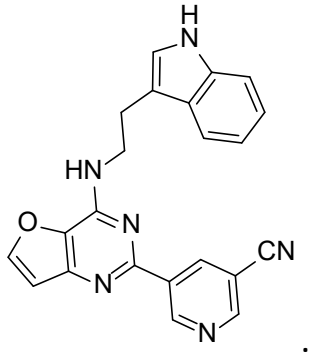
;

N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-7-isopropil-2-(5-metilpiridin-3-il)tieno[3,2-*d*]pirimidin-4-amina (“CRL21”)



; e

5-(4-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)furo[3,2-*d*]pirimidin-2-il)nicotinonitrila (“CRL22”)



.

7.3. Exemplo 3: Caracterização de células NK de três estágios

MÉTODOS

[0522] As células UCB CD34 + foram cultivadas na presença de citocinas incluindo trombopoietina, SCF, ligante Flt3, IL-7, IL-15 e IL-2 por 35 dias para produzir células NK de três estágios, conforme descrito no Exemplo 1. A citometria de fluxo multicolorida foi usada para determinar as características fenotípicas de células NK de três estágios.

[0523] Para os testes biológicos, os compostos foram fornecidos à cultura para avaliar seus efeitos na expansão e diferenciação das células NK. Especificamente, os doadores de células CD34 + (StemCell Technology) foram descongelados e expandidos in vitro seguindo o protocolo de cultura NK. Durante os primeiros 14 dias de cultura, cada composto CRL foi dissolvido em DMSO e adicionado à cultura a uma concentração de 10 µM. SR1 (a 10 µM) serviu como um composto de controle positivo, enquanto DMSO sozinho sem qualquer composto serviu como um controle negativo. No final da cultura no Dia 35, a expansão celular, a diferenciação de células exterminadoras naturais (NK) e a citotoxicidade das células contra a linha de células tumorais K562 foram caracterizadas. Devido ao grande número de compostos, o teste foi realizado em dois experimentos, CRL1-11 e CRL 12-22. Os mesmos doadores foram usados para cada experimento. Controles positivos e negativos também foram incluídos em ambos os experimentos.

Resultados

[0524] Os dados de expansão celular mostraram que 20 dos 22 compostos suportaram a expansão NK na concentração de 10 μM. Exceto para CRL7 e CRL13, todos os outros compostos resultaram em uma expansão NK de 2.000 ~ 15.000 vezes ao longo de 35 dias (FIG. 1 e FIG. 2). Entre todos os compostos, CRL19, 20 e 22 suportaram melhor a expansão celular e demonstraram um nível semelhante de expansão em comparação com SR1 no Dia 35 (FIG. 3). A expansão das células CD34 no Dia 14 da cultura mostrou uma tendência semelhante de que a maioria dos compostos suportou a expansão das células CD34, e CRL19, 20 e 22 alcançaram a maior expansão das células CD34 no Dia 14 (FIG. 4).

[0525] O ensaio de citotoxicidade foi executado usando células cultivadas com compostos contra células tumorais K562 em razão efetor para alvo de 10:1 (FIG. 5) para avaliar as funções celulares. Os resultados mostraram que as células cultivadas com compostos mataram 30 ~ 60% das células K562 na razão E:T de 10:1, indicando que as células apresentam funções NK. Para ambos os doadores, as células cultivadas com CRL17, 18, 19 e 21 demonstraram atividades de morte semelhantes ou maiores em comparação com as cultivadas com SR1.

Conclusões:

[0526] Em resumo, descobrimos que todos os compostos, exceto CRL7 e CRL13, suportam a expansão e diferenciação PNK-007. A expansão com os compostos variou de 2.000 ~ 15.000 vezes em 35 dias, e a cultura atingiu mais de 70% das células NK. Entre esses compostos, CRL 19, 20 e 22 demonstraram perfis de expansão, diferenciação e citotoxicidade muito semelhantes aos SR1 para cultura PNK-007. CRL 17, 18 e 21 resultou em uma expansão ligeiramente menor em comparação com SR1, mas aumentou a subpopulação CD56 +/CD11a + e também aumentou as atividades de morte das células.

7.4 Exemplo 4: Caracterização adicional de células NK de três estágios

MÉTODOS

[0527] Células: PBMC congeladas foram adquiridas de Stem Cell Technologies. Células NKs derivadas de sangue periférico (PB-NK) foram isoladas de sangue fresco de dadores saudáveis usando o Human NK Cell Enrichment Kit (Stem Cell Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. As células CYNK foram geradas a partir de células-tronco CD34 + derivadas do sangue do cordão umbilical (Ref: Zhang et al. J Immunother Cancer. 2015). Resumidamente, as células CD34 + foram cultivadas na presença de citocinas incluindo tromobopoietina, SCF, ligante Flt3, IL-7, IL-15 e IL-2 durante 35 dias. As células PBNK e CYNK foram criopreservadas até a análise.

[0528] Classificação de células ativadas magneticamente: as células PNK foram coradas com células CD11a anti-humano de camundongo PE (BD) e células CD11a + PNK concentradas usando MicroBeads anti-PE de acordo com as instruções do fabricante (Miltenyi Biotec).

[0529] Sequenciamento de RNA de célula única: as células CYNK foram combinadas com PB-NK na razão de 1:1 e a expressão gênica analisada em nível de célula única usando a plataforma 10X Genomics Chromium e sequenciamento Illumina. A análise de bioinformática utilizou o pipeline de análise 10X Genomics Cell Ranger.

[0530] Citometria de fluxo: as células criopreservadas foram rapidamente descongeladas em banho-maria a 37 °C e lavadas uma vez em RPMI1640 + 10% de hiFBS (soro fetal bovino inativado por calor, Gibco), seguido de coloração Aqua fixável LIVE/DEAD™ em PBS. As células foram lavadas com tampão FACS (PBS + 2% FBS) seguido de incubação em solução de bloqueio (tampão de coloração brilhante, controle de isotipo k de IgG2a de camundongo e Bloco Fc de BD humano (todos de BD)). As células foram lavadas com tampão FACS e incubadas com anticorpos acoplados a fluoróforo em tampão FACS por 25 min em gelo. As células foram lavadas com tampão FACS antes da análise em

citômetro de fluxo Fortessa X20 (BD).

[0531] qRT-PCR: o RNA foi isolado das células usando o kit Quick-RNA Miniprep (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado usando SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) em uma reação padrão. A RT-PCR foi realizada usando ensaios de expressão do gene Taqman (Applied Biosystems). Os níveis de expressão foram calculados em relação a GAPDH (Hs02758991) usando o método ΔΔCt.

RESULTADOS

[0532] As células CYNK matam com eficiência várias linhagens de células tumorais in vitro, no entanto, os mecanismos que as células CYNK usam para induzir a morte celular permanecem pouco compreendidos (ref). Para elucidar sobre os receptores de células NK ativadores, as vias de sinalização intracelular e os mecanismos moleculares que as células CYNK empregam para realizar seus papéis funcionais, usamos o sequenciamento de RNA de célula única (scRNAseq) como uma abordagem imparcial para comparar as células CYNK com as células NK do sangue periférico (PB-NK) (FIG. 6A). O agrupamento transcricional imparcial revelou duas assinaturas distintas diferenciando entre as células CYNK e PB-NK (FIG. 6B). As tabelas 1 e 2 listam os 50 principais genes regulados positivamente por agrupamento nas células PB-NK e CYNK, respectivamente. O conjunto de genes expresso mais alto em células PB-NK incluiu genes associados a funções funcionais de células NK, incluindo FGFBP2, granzimas (GZMH, GZMM), CXCR4, KLRF1, KLF2, IFNG (Tabela 1).

 FGFBP2, que codifica a proteína de ligação ao fator de crescimento de fibroblastos, é conhecido por ser secretado por linfócitos citotóxicos.

 Granzimas são um grupo de serina proteases armazenadas nos grânulos citotóxicos das células NK e dos linfócitos T citotóxicos (ref). Embora GzmA e GzmB induzam a morte de células alvo após a liberação em seu citoplasma e têm

sido extensivamente estudados, menos se sabe sobre o papel funcional de GzmH, GzmK e GzmM.

 CXCR4 regula o direcionamento das células NK para a medula óssea.

 KLRF1 codifica NKp80, um imunorreceptor de tipo C de ativação semelhante à lectina que é ativado após a ligação à lectina de tipo C induzida por ativação (AICL), induzindo citotoxicidade de células NK e secreção de citocinas.

 Fator de transcrição KLF2 que regula a proliferação e a sobrevivência das células NK.

 IFN-γ derivado de células NK (gene IFNG) é um fator imunorregulador chave secretado por células NK ativadas que promove a resposta imune adaptativa por meio da modulação das respostas das células dendríticas e das células T.

Tabela 1. Os 50 principais genes regulados positivamente por agrupamento PB-NK.

	ID da Característica	Nome da Característica	Média de CYNK	Média de PB-NK	Número de vezes da mudança log2 de PB-NK	valor de p de PB-NK
1	ENSG00000137441	FGFBP2	0,099352	2,935962	4,88363	4,09E-78
2	ENSG00000100450	GZMH	0,136708	2,484828	4,182845	2,49E-58
3	ENSG00000276085	CCL3L3	0,07215	1,25185	4,11514	2,13E-

	ID da Característica	Nome da Característica	Média de CYNK	Média de PB-NK	Número de vezes da mudança log2 de PB-NK	valor de p de PB-NK
	85		2	2	3	49
4	ENSG00000197540	GZMM	0,134235	1,982728	3,883559	1,40E-50
5	ENSG00000121966	CXCR4	0,403236	5,935725	3,879087	9,19E-51
6	ENSG00000169554	ZEB2	0,127877	1,860789	3,861967	7,03E-50
7	ENSG00000127528	KLF2	0,172475	1,92761	3,481483	1,86E-40
8	ENSG00000189067	LITAF	0,297791	3,231559	3,439184	1,06E-39
9	ENSG00000069667	RORA	0,101913	1,055542	3,371425	3,26E-37
10	ENSG00000145220	LYAR	0,142448	1,306592	3,196402	2,39E-33
11	ENSG00000125107	CNOT1	0,208595	1,809824	3,116348	3,39E-32
12	ENSG00000111537	IFNG	0,193317	1,639941	3,083863	1,11E-29

	ID da Característica	Nome da Característica	Média de CYNK	Média de PB-NK	Número de vezes da mudança log2 de PB-NK	valor de p de PB-NK
13	ENSG00000158050	DUSP2	0,407744	3,322164	3,025836	4,12E-30
14	ENSG00000110046	ATG2A	0,190226	1,508942	2,987028	3,39E-29
15	ENSG00000173762	CD7	0,492697	3,641922	2,885402	1,77E-27
16	ENSG00000141682	PMAIP1	0,252398	1,820017	2,849558	6,51E-26
17	ENSG00000078304	PPP2R5C	0,381864	2,591665	2,762207	6,15E-25
18	ENSG00000153234	NR4A2	0,399174	2,622622	2,715393	5,59E-24
19	ENSG00000152518	ZFP36L2	0,856899	5,585388	2,703993	4,72E-24
20	ENSG00000145675	PIK3R1	0,325168	2,078618	2,675822	2,70E-23
21	ENSG00000150045	KLRF1	0,191285	1,177103	2,620822	4,78E-22
22	ENSG00000255169	SNHG9	0,516988	2,951815	2,512931	1,34E-

	ID da Característica	Nome da Característica	Média de CYNK	Média de PB-NK	Número de vezes da mudança log2 de PB-NK	valor de p de PB-NK
	98		3	8	7	20
23	ENSG00000125148	MT2A	0,515041	2,913311	2,499426	9,06E-20
24	ENSG00000116741	RGS2	0,203737	1,147279	2,492865	1,51E-19
25	ENSG00000153922	CHD1	0,252574	1,350762	2,418474	9,42E-19
26	ENSG00000120129	DUSP1	2,078529	9,865317	2,24638	2,58E-16
27	ENSG00000143924	EML4	0,256284	1,150299	2,165756	7,80E-15
28	ENSG00000128016	ZFP36	2,22866	9,777355	2,132849	1,32E-14
29	ENSG00000163874	ZC3H12A	0,261759	1,120475	2,097382	7,47E-14
30	ENSG00000105993	DNAJB6	0,6506	2,667169	2,035058	2,98E-13
31	ENSG00000126524	SBDS	0,534822	2,185078	2,030148	3,57E-13

	ID da Característica	Nome da Característica	Média de CYNK	Média de PB-NK	Número de vezes da mudança log2 de PB-NK	valor de p de PB-NK
32	ENSG00000125347	IRF1	1,450448	5,812277	2,002193	7,32E-13
33	ENSG00000157514	TSC22D3	1,103379	4,30409	1,963373	2,57E-12
34	ENSG00000184205	TSPYL2	0,592137	2,247746	1,924086	1,14E-11
35	ENSG00000146278	PNRC1	1,362312	5,156149	1,919832	7,77E-12
36	ENSG00000135070	ISCA1	0,27898	1,043084	1,90227	2,06E-11
37	ENSG00000171223	JUNB	4,09462	15,11622	1,883884	2,20E-11
38	ENSG00000156232	WHAMM	0,316425	1,146147	1,856513	7,14E-11
39	ENSG00000164327	RICTOR	0,318279	1,101977	1,791406	3,85E-10
40	ENSG00000118503	TNFAIP3	0,550807	1,902316	1,787777	3,93E-10
41	ENSG00000120	EPC1	0,56219	1,84606	1,71495	2,17E-

	ID da Característica	Nome da Característica	Média de CYNK	Média de PB-NK	Número de vezes da mudança log2 de PB-NK	valor de p de PB-NK
	16		9	6	3	09
42	ENSG00000167508	MVD	0,309448	1,00722	1,702322	4,11E-09
43	ENSG00000013441	CLK1	0,690164	2,216412	1,682859	4,62E-09
44	ENSG00000188042	ARL4C	0,437325	1,388136	1,666056	8,18E-09
45	ENSG00000162924	REL	0,553809	1,736208	1,648145	1,14E-08
46	ENSG00000005483	KMT2E	0,7940	2,460289	1,631225	1,47E-08
47	ENSG00000119801	YPEL5	0,966141	2,98202	1,625617	1,70E-08
48	ENSG00000123505	AMD1	0,558578	1,664102	1,574595	6,03E-08
49	ENSG00000159388	BTG2	0,751541	2,22132	1,563151	7,55E-08
50	ENSG00000010404	IDS	0,723193	2,128073	1,556757	8,48E-08

[0533] Os principais genes diferencialmente expressos no agrupamento CYNK que codificam fatores associados ao papel funcional das células NK incluem receptores de superfície e co-receptores (CD96, NCR3, CD59, KLRC1), TNFSF10, genes de ponto de controle imunológico (TNFRSF18, TNFRSF4, HAVCR2), genes da molécula adaptadora do receptor de células NK (FCER1G e LAT2) (Tabela 2).

Tabela 2. Os 50 principais genes regulados positivamente por agrupamento CYNK.

	ID da Característica	Nome da Característica	Média de PBNK	Média de CYNK	Número de vezes de mudança log2 de CYNK	valor de p de CYNK
1	ENSG00000102471	NDFIP2	0,077391	1,459819	4,230949	1,69E-22
2	ENSG00000242258	LINC00996	0,063046	1,183921	4,222944	5,04E-22
3	ENSG00000172005	MAL	0,057005	1,035293	4,173813	1,35E-21
4	ENSG00000108702	CCL1	0,078524	1,334494	4,080611	5,11E-09
5	ENSG00000198125	MB	0,10193	1,683947	4,041355	1,45E-20
6	ENSG00000128040	SPINK2	0,087962	1,233641	3,804242	7,88E-19

	ID da Característica	Nome da Característica	Média de PBNK	Média de CYNK	Número de vezes de mudança log2 de CYNK	valor de p de CYNK
7	ENSG00000166920	C15orf48	0,078901	1,018246	3,683547	6,40E-18
8	ENSG00000134072	CAMK1	0,151762	1,932724	3,667647	2,13E-18
9	ENSG00000134545	KLRC1	0,509273	4,740451	3,217889	9,47E-16
10	ENSG00000121858	TNFSF10	0,295975	2,682764	3,178801	6,44E-15
11	ENSG00000186891	TNFRSF18	1,182011	10,09017	3,093605	6,96E-15
12	ENSG00000008517	IL32	4,345617	37,08234	3,093395	6,60E-15
13	ENSG00000042493	CAPG	0,369213	3,112494	3,074529	9,91E-15
14	ENSG00000235576	AC092580.4	0,44736	3,660475	3,031759	2,23E-14
15	ENSG00000163191	S100A11	0,41527	3,364804	3,017543	2,42E-14
16	ENSG00000186	TNFRSF4	0,13552	1,09781	3,01448	1,91E-

	ID da Característica	Nome da Característica	Média de PBNK	Média de CYNK	Número de vezes de mudança log2 de CYNK	valor de p de CYNK
	27		9	6		13
17	ENSG00000074800	ENO1	2,166202	16.05066	2,889567	1,86E-13
18	ENSG000015886 9	FCER1G	0,734274	5,393877	2,876632	2,43E-13
19	ENSG000001189 71	CCND2	0,457175	3,324621	2,861636	3,21E-13
20	ENSG000002054 26	KRT81	0,169883	1,187806	2,803005	3,69E-12
21	ENSG000002439 27	MRPS6	0,358643	2,29304	2,675597	6,10E-12
22	ENSG000001827 18	ANXA2	0,206125	1,282389	2,635118	3,48E-11
23	ENSG000001253 84	PTGER2	0,175546	1,08713	2,628037	4,29E-11
24	ENSG000001247 67	GLO1	0,214053	1,289543	2,588793	6,50E-11
25	ENSG000001350 77	HAVCR2	0,175924	1,031051	2,548543	1,51E-10

	ID da Característica	Nome da Característica	Média de PBNK	Média de CYNK	Número de vezes de mudança log2 de CYNK	valor de p de CYNK
26	ENSG00000103490	PYCARD	0,183097	1,070527	2,545209	1,34E-10
27	ENSG00000086730	LAT2	0,178566	1,041567	2,541707	1,53E-10
28	ENSG00000141526	SLC16A3	0,282006	1,622835	2,523282	1,73E-10
29	ENSG00000103187	COTL1	0,894342	5,013779	2,486834	1,45E-10
30	ENSG00000067225	PKM	1,099712	6,145949	2,482453	1,11E-10
31	ENSG00000177156	TALDO1	0,196687	1,084745	2,46115	4,23E-10
32	ENSG00000153283	CD96	0,368458	2,029162	2,460314	1,66E-10
33	ENSG00000204475	NCR3	0,640272	3,472457	2,438804	2,31E-10
34	ENSG00000170442	KRT86	0,257845	1,372733	2,410873	1,02E-09
35	ENSG00000117	STMN1	0,46887	2,41349	2,36315	1,22E-

	ID da Característica	Nome da Característica	Média de PBNK	Média de CYNK	Número de vezes de mudança log2 de CYNK	valor de p de CYNK
	32		8	9		09
36	ENSG00000227507	LTB	3,831437	19,41653	2,341609	1,09E-09
37	ENSG00000130429	ARPC1B	0,570053	2,846585	2,31957	1,27E-09
38	ENSG00000162704	ARPC5	0,347317	1,717418	2,30484	1,66E-09
39	ENSG00000088832	FKBP1A	0,40017	1,978205	2,304629	1,60E-09
40	ENSG00000102265	TIMP1	0,385447	1,902345	2,302248	1,96E-09
41	ENSG00000113088	GZMK	0,290312	1,403201	2,27168	1,37E-08
42	ENSG00000085063	CD59	0,215186	1,035997	2,265377	7,12E-09
43	ENSG00000102144	PGK1	1,405879	6,735348	2,260328	2,92E-09
44	ENSG00000148908	RGS10	0,217451	1,014713	2,220352	1,33E-08

	ID da Característica	Nome da Característica	Média de PBNK	Média de CYNK	Número de vezes de mudança log2 de CYNK	valor de p de CYNK
45	ENSG00000196405	EVL	1,186164	5,504715	2,214345	5,41E-09
46	ENSG00000128340	RAC2	1,063092	4,917253	2,209516	5,72E-09
47	ENSG00000100097	LGALS1	4,427539	20,46621	2,208968	6,05E-09
48	ENSG00000139626	ITGB7	0,50059	2,285445	2,19016	8,54E-09
49	ENSG00000196230	TUBB	1,062715	4,838214	2,186651	1,22E-08
50	ENSG00000171314	PGAM1	0,670096	3,046436	2,18433	8,56E-09

[0534] Para entender melhor como a resposta citotóxica é iniciada em células CYNK, analisamos especificamente a expressão de genes escolhidos manualmente que codificam proteínas bem caracterizadas, levando da detecção de alvo a uma resposta citolítica, com foco principal em receptores de células NK e molécula adaptadora (Tabela 3). A análise da expressão diferencial do gene mostrou alta expressão das duas moléculas citotóxicas chave perforina (PRF1) e granzima B (GZMB) em células CYNK. Da mesma forma, a maioria dos receptores

que foram diferencialmente expressos entre as células CYNK e PB-NK, com exceção de KLRF1 (que codifica NKp80), foram expressos de forma mais elevada nas células CYNK. A expressão de genes efetores e receptores de células NK selecionados é visualizada em gráficos tSNE na FIG. 6C. A expressão elevada de genes que codificam componentes do maquinário citotóxico das células NK se correlaciona bem com a alta atividade citotóxica das células CYNK contra uma ampla gama de células alvo.

Tabela 3. Principais genes expressos diferencialmente que codificam fatores que regulam a função citolítica das células NK. Genes que tinham <1 contagem por célula em todo o agrupamento foram excluídos.

	ID da Característica	**Nome da Característica**	**Nome alternativo**	**Média de CYNK**	**Média de PBNK**	**Número de vezes de mudança log2 de CYNK**	**valor de p de CYNK**
1	ENSG00000134545	KLRC1	NKG2A, CD159a	4,740451	0,509273	3,217889	9,47E-16
2	ENSG00000121858	TNFSF10	TRAIL	2,682764	0,295975	3,178801	6,44E-15
3	ENSG00000186891	TNFRSF18	GITR	10,09017	1,182011	3,093605	6,96E-15
4	ENSG00000186827	TNFRSF4	CD134, OX40	1,097816	0,135529	3,014481	1,91E-13

5	ENSG00000135077	HAVCR2	TIM-3	1,031051	0,175924	2,548543	1,51E-10
6	ENSG00000153283	CD96	Tactile	2,029162	0,368458	2,460314	1,66E-10
7	ENSG00000204475	NCR3	CD337, NKp30	3,472457	0,640272	2,438804	2,31E-10
8	ENSG00000085063	CD59	MAC-IP, MIRL, protectina	1,035997	0,215186	2,265377	7,12E-09
9	ENSG00000139626	ITGB7		2,285445	0,50059	2,19016	8,54E-09
10	ENSG00000180644	PRF1		3,589295	0,887169	2,016259	8,95E-08
11	ENSG00000100453	GZMB		11,6194	3,515453	1,725026	4,27E-06
12	ENSG00000100385	IL2RB		2,568753	0,956632	1,424929	0,000126
13	ENSG00000205809	KLRC2	NKG2C, CD159c	1,419451	0,784861	0,854636	0,026587
14	ENSG00000111796	KLRB1	CD161	18,74844	10,45953	0,842324	0,027995
15	ENSG00000150045	KLRF1	NKp80	0,191285	1,177103	-2,62082	4,78E-22

[0535] Em seguida, analisamos o perfil transcripcional de células CYNK e PB-

NK por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) com foco em genes associados a células NK selecionados que foram altamente e/ou diferencialmente expressos no conjunto de dados scRNAseq (FIG. 7). O RNA foi extraído de células naïve recém-descongeladas após o isolamento ou cultura. qRT-PCR demonstrou alta expressão de CD69, KLRK1 e KLRB1 em relação ao gene de manutenção GAPDH em ambas as células CYNK e PB-NK, enquanto KLRK1 e KLRB1, codificando para NKG2D e CD161/KLRB1, respectivamente, foram significativamente maiores expressos em células PB-NK. A expressão diferencial significativa de NKp80, codificada pelo gene KLRF1, observada anteriormente por scRNAseq (Tabela 3), foi confirmada por qRT-PCR. Da mesma forma, KLRD1 foi mais expresso em PB-NK em comparação com células CYNK. Juntos, os dados mostram uma expressão mais elevada do receptor tipo lectina de células exterminadoras inibitórias (KLRB1, KLRD1, KLRF1) em células PB-NK quando comparadas com células CYNK. Os dois genes do receptor de lectina do tipo C, KLRC1 e KLRC2, que codificam o NKG2A inibitório e o NKG2C ativador, foram mais expressos em células CYNK. Dos receptores naturais de citotoxicidade (NCRs), apenas NCR2 (codificando NKp44) foi diferencialmente expresso com alta expressão em células CYNK e quase nenhuma expressão em células PB-NK. Dois genes de receptor de células NK coativadores CD244 (2B4) e CD226 (DNAM-1) foram ligeiramente mais expressos em PB-NK em comparação com células CYNK. Juntamente com os genes do receptor de células NK ativados por ligante típicos, também analisamos a expressão de FCGR3A que codifica um receptor Fc CD16 que é necessário para a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos. Enquanto os dados de scRNAseq não demonstraram expressão diferencial significativa de FCGR3A, por qRT-PCR ele foi altamente expresso nas células PB-NK e em um nível muito baixo nas células CYNK. A expressão de dois genes TNFRSF18 e TNFSF10 que foram expressos de forma altamente diferencial por scRNAseq e elevados

no agruoamento CYNK também foi analisada por qRT-PCR. Os dados de PCR confirmam a alta expressão desses genes que codificam para GITR e TRAIL, respectivamente, em células CYNK em relação ao baixo nível de expressão em células PB-NK.

[0536] Por último, caracterizamos as células CYNK em relação a PB-NK pela expressão de proteínas de superfície usando citometria de fluxo. Os anticorpos direcionados a vários receptores de células NK foram escolhidos com base na caracterização transcricional por scRNAseq e qRT-PCR (Tabelas 1-3, GIG. 6 e FIG. 7). As células NK expressam alto nível do marcador de células NK CD56 e não apresentam a expressão dos marcadores de células T, células B e células mieloides CD3, CD19 e CD14, respectivamente (FIG. 8). Enquanto a maioria das células PB-NK expressa CD56 em um nível baixo, um pequeno subconjunto de células PB-NK expressa CD56 em um nível visto em células CYNK (FIG. 9). A análise de NCR demonstrou uma alta expressão de NKp44 em células CYNK, enquanto que NKp44 foi expresso em um nível baixo em PB-NK, correspondendo bem à análise transcripcional (FIG. 7). NKp80, por outro lado, foi expresso em células PB-NK e pouco em CYNK, também confirmando os dados de transcrição da expressão de KLRF1 (Tabela 1 e FIG. 7). CD16 não foi virtualmente expresso em células CYNK, enquanto a maioria das células PB-NK expressou CD16 em alto nível. A expressão da proteína CD16, portanto, também corresponde bem à análise transcripcional (Tabela 1 e FIG. 7). A expressão de receptores semelhantes à lectina de células exterminadoras foi comparável entre as células CYNK e PB-NK, com as células CYNK demonstrando maior intensidade de fluorescência média em comparação com as células PB-NK para NKG2D, NKG2C, CD94 (NKG2C) e NKG2A. GITR, uma molécula inibidora de ponto de controle, codificada por TNFRSF18, não foi expressa em células PB-NK, mas altamente em todas as células CYNK, correlacionando-se bem com os dados de qRT-PCR.

[0537] Usamos o conjunto de dados de citometria de fluxo (FIG. 8 e FIG. 9) para realizar uma análise imparcial da expressão do marcador de superfície em populações de células CYNK e PB-NK (FIG. 10). As células CYNK e PBMC coradas com anticorpos foram misturadas para aquisição e analisadas por citometria de fluxo. É evidente a partir dos gráficos de tSNE que as células CYNK e PB-NK se agrupam separadamente umas das outras e de outras células do sangue periférico ao observar a localização de células CD56- e CD3/CD14/CD19-positivas no gráfico. A alta expressão de NKp44 (CD336) e GITR (CD357) permite a identificação de células CYNK, pois o GITR não é virtualmente expresso em nenhum tipo de célula nos subconjuntos de PBMC. As células PB-NK, por outro lado, expressam altamente CD16 e NKp80 que não são expressos nas células CYNK. Ao todo, identificamos marcadores de superfície celular que permitem distinguir células CYNK de PB-NK com alta confiança.

Equivalentes:

[0538] A presente invenção não deve ser limitada no seu escopo pelas modalidades específicas descritas neste documento. De fato, várias modificações da invenção, além das descritas, irão se tornar evidentes aos versados na técnica, a partir da descrição anterior e figuras anexas. Tais modificações pretendem ser abrangidas pelo escopo das reivindicações anexas.

[0539] Todas as referências citadas estão incorporadas neste documento por referência na sua totalidade e para todos os propósitos na mesma medida como se cada publicação individual, pedido de patente ou patente fosse específica e individualmente indicado para estar incorporado por referência na sua totalidade para todos os propósitos. A citação de qualquer publicação é para a sua divulgação antes da data de depósito e não deve ser interpretada como uma admissão de que a presente invenção não tem o direito de anteceder tal publicação em virtude de invenção anterior.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de produção de uma população de células compreendendo células *natural killer*, **caracterizado** pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células;

(b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e

(c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem cada um de um agente de mobilização de células-tronco e heparina de baixo peso molecular (LMWH), para produzir uma terceira população de células;

em que a terceira população de células compreende células *natural killer* que são CD56 +, CD3-, e em que pelo menos 80% das células *natural killer* são viáveis.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a dita terceira população de células compreende células *natural killer* que são CD94+ ou CD16+.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a dita terceira população de células compreende células *natural killer* que são CD94- ou CD16-.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a dita terceira população de células compreende células *natural killer* que são CD94+ e CD16+.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a dita terceira população de células compreende células *natural killer* que são

CD94- e CD16-.

6. Método de produção de uma população de células compreendendo células *natural killer*, **caracterizado** pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células;

(b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e

(c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem LMWH, para produzir uma terceira população de células;

em que a terceira população de células compreende células *natural killer* que são CD56+, CD3- e CD11a+.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que o terceiro meio não tem o fator de células-tronco (SCF).

8. Método de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que o terceiro meio não tem LMWH.

9. Método de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma etapa adicional de (d) isolar as células CD11a+ da terceira população de células para produzir uma quarta população de células;

em que a quarta população de células compreende células *natural killer* que são CD56+, CD3- e CD11a+.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 9, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células *natural killer* expressam perforina e EOMES.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 10,

caracterizado pelo fato de que as ditas células *natural killer* não expressam RORγt ou IL1R1.

12. Método de produção de uma população de células compreendendo células ILC3, **caracterizado** pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células;

(b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células; e

(c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem LMWH, para produzir uma terceira população de células;

em que a terceira população de células compreende células ILC3 que são CD56+, CD3- e CD11a-.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que o terceiro meio compreende um agente de mobilização de células-tronco.

14. Método de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que o terceiro meio compreende SCF.

15. Método de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que o terceiro meio compreende um agente de mobilização de células-tronco e SCF.

16. Método de produção de uma população de células compreendendo células ILC3, **caracterizado** pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) cultivar células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras em um primeiro meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e trombopoietina (Tpo) para produzir uma primeira população de células;

(b) cultivar a primeira população de células em um segundo meio compreendendo um agente de mobilização de células-tronco e interleucina-15 (IL-15), e sem Tpo, para produzir uma segunda população de células;

(c) cultivar a segunda população de células em um terceiro meio compreendendo IL-2 e IL-15, e sem cada um de um agente de mobilização de células-tronco e LMWH, para produzir uma terceira população de células; e

(d) isolar as células CD11a da terceira população de células para produzir uma quarta população de células;

em que a quarta população de células compreende células ILC3 que são CD56+, CD3- e CD11a-.

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 16, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células ILC3 expressam RORγt e IL1R1.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 17, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células ILC3 não expressam perforina ou EOMES.

19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, **caracterizado** pelo fato de que o dito terceiro meio não tem glicosaminoglicanas dessulfatadas.

20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são células de mamífero.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são células humanas.

22. Método de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são células de primatas.

23. Método de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são células de caninos.

24. Método de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são células de roedores.

25. Método de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são células de um mamífero diferente de um humano, primata, canino ou roedor.

26. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são células-tronco hematopoiéticas CD34+.

27. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são células da placenta.

28. Método de acordo com a reivindicação 27, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células da placenta são obtidas ou podem ser obtidas a partir de perfusato da placenta humana.

29. Método de acordo com a reivindicação 27, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células da placenta são obtidas ou podem ser obtidas a partir de células nucleadas isoladas de perfusato da placenta humana.

30. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são obtidas ou podem ser obtidas a partir do sangue do cordão umbilical.

31. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células-tronco hematopoiéticas ou

progenitoras são células hepáticas fetais.

32. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são células do sangue periférico mobilizado.

33. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras são células da medula óssea.

34. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 33, **caracterizado** pelo fato de que o dito Tpo está presente no primeiro meio a uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL.

35. Método de acordo com a reivindicação 34, **caracterizado** pelo fato de que o dito Tpo está presente no primeiro meio a uma concentração de 20 ng/mL a 30 ng/mL.

36. Método de acordo com a reivindicação 34, **caracterizado** pelo fato de que o dito Tpo está presente no primeiro meio a uma concentração de cerca de 25 ng/mL.

37. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 36, **caracterizado** pelo fato de que a dita IL-15 está presente no dito segundo meio a uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL.

38. Método de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado** pelo fato de que a dita IL-15 está presente no dito segundo meio a uma concentração de 10 ng/mL a 30 ng/mL.

39. Método de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado** pelo fato de que a dita IL-15 está presente no dito segundo meio a uma concentração de cerca de 20 ng/mL.

40. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, **caracterizado** pelo fato de que a dita IL-2 está presente no dito terceiro meio a

uma concentração de 10 U/mL a 10.000 U/mL e a dita IL-15 está presente no dito terceiro meio a uma concentração de 1 ng/mL a 50 ng/mL.

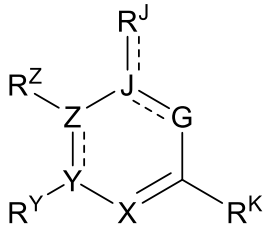
41. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, **caracterizado** pelo fato de que a dita IL-2 está presente no dito terceiro meio a uma concentração de 300 U/mL a 3.000 U/mL e a dita IL-15 está presente no dito terceiro meio em uma concentração de 10 ng/mL a 30 ng/mL.

42. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, **caracterizado** pelo fato de que a dita IL-2 está presente no dito terceiro meio a uma concentração de cerca de 1.000 U/mL e a dita IL-15 está presente no dito terceiro meio a uma concentração de cerca de 20 ng/mL.

43. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 42, **caracterizado** pelo fato de que os ditos Tpo, IL-2 e IL-15 não estão compreendidos em um componente indefinido do primeiro meio, segundo meio ou terceiro meio.

44. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 42, **caracterizado** pelo fato de que os ditos Tpo, IL-2 e IL-15 não estão incluídos no soro.

45. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 44, **caracterizado** pelo fato de que o dito agente de mobilização de células-tronco é um composto de Fórmula (I) com a seguinte estrutura:



(I)

incluindo sais farmaceuticamente aceitáveis do mesmo, em que:

cada ------ representa independentemente uma ligação simples ou dupla;

R^J é selecionado a partir do grupo que consiste em–NR^aR^b, -OR^b, e =O; em que se R^J for =O, então ------ unindo G e J representa uma ligação simples e G é N e o N é substituído por R^G; caso contrário ------ unindo G e J representa uma ligação dupla e G é N;

R^a é hidrogênio ou C_1-C_4 alquila;

R^b é R^c ou -(C_1-C_4 alquil)-R^c;

R^c é selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, -O(C_1-C_4 alquila), -O(C_1-C_4 haloalquila); -C(=O)NH_2; C_{6-10} arila não substituída; C_{6-10} arila substituída; heteroarila não substituída de cinco a dez membros possuindo 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituída por 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção R^c indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes E, em que cada E é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila);

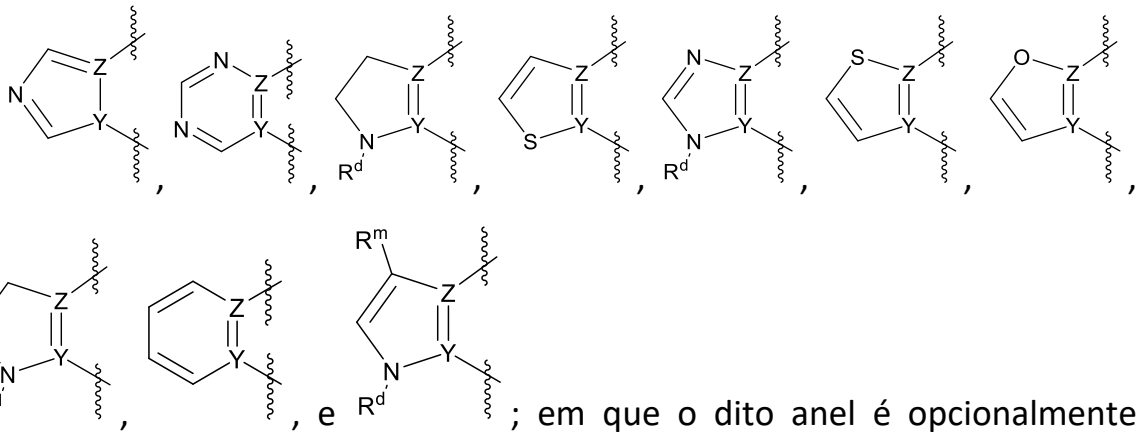
R^K é selecionado a partir do grupo que consiste em: hidrogênio, C_{1-6} alquila não substituída; C_{1-6} alquila substituída; -NH(C_{1-4} alquila); -N(C_{1-4} alquila)$_2$, C_{6-10} arila não substituída; C_{6-10} arila substituída; heteroarila não substituída de cinco a dez membros tendo 1 a 4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituída por 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção R^K indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes Q, em que cada Q é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila), e -O-(C_{1-4} haloalquila);

R^G é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, C_{1-4} alquila, e -(C_{1-4} alquil)-C(=O)NH_2;

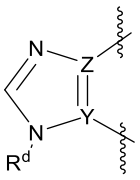
R^Y e R^Z são, cada um, independentemente ausentes ou selecionados a partir

do grupo que consiste em: hidrogênio, halo, C_{1-6} alquila, -OH, -O-(C_{1-4} alquila), -NH(C_{1-4} alquila), e -N(C_{1-4} alquila)$_2$;

ou R^Y e R^Z tomados em conjunto com os átomos aos quais eles estão ligados são unidos para formar um anel selecionado a partir de:



; em que o dito anel é opcionalmente substituído por um, dois ou três grupos independentemente selecionados a partir de C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -OH, -O-(C_{1-4} alquila), -N(C_{1-4} alquila)$_2$, C_6-C_{10} arila não substituída, C_6-C_{10} arila substituída por 1 a 5 átomos halo e -O-(C_{1-4} haloalquila); e em que se R^Y e R^Z tomados em conjunto formarem



, então R^J é -OR^b ou =O;

R^d é hidrogênio ou C_1-C_4 alquila;

R^m é selecionado a partir do grupo que consiste em C_{1-4} alquila, halo e ciano;

J é C; e

X, Y e Z são cada um independentemente N ou C, em que a valência de qualquer átomo de carbono é preenchida conforme necessário com átomos de hidrogênio.

46. Método de acordo com a reivindicação 45, **caracterizado** pelo fato de que:

R^a é hidrogênio;

R^b é -(C_1-C_4 alquil)-R^c;

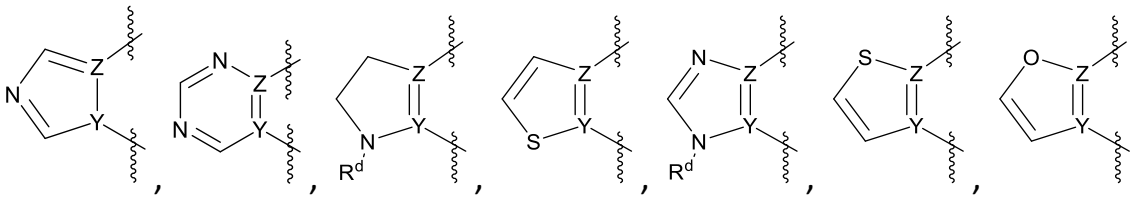
R^c é selecionado a partir do grupo que consiste em: -C(=O)NH_2; C_{6-10} arila não substituída; C_{6-10} arila substituída; heteroarila não substituída de cinco a dez membros possuindo 1 a 4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituída por 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção R^c indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes E, em que cada E é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila);

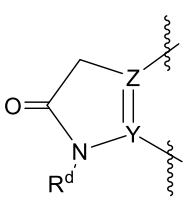
R^K é selecionado a partir do grupo que consiste em: hidrogênio, C_{1-6} alquila não substituída; -NH(C_{1-4} alquila); -N(C_{1-4} alquila)$_2$, C_{6-10} arila não substituída; C_{6-10} arila substituída; heteroarila não substituída de cinco a dez membros tendo 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituída por 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção R^K indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes Q, em que cada Q é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila), e -O-(C_{1-4} haloalquila);

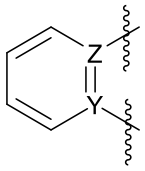
R^G é -(C_{1-4} alquil)-C(=O)NH_2;

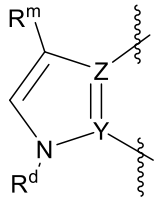
R^Y e R^Z são, cada um, independentemente ausentes ou selecionados a partir do grupo que consiste em: hidrogênio, C_{1-6} alquila e -NH(C_{1-4} alquila);

ou R^Y e R^Z tomados em conjunto com os átomos aos quais eles estão ligados são unidos para formar um anel selecionado a partir de:





, 

, e 

; em que o dito anel é opcionalmente substituído por um, dois ou três grupos independentemente selecionados a partir de C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -OH, -O-(C_{1-4} alquila), -N(C_{1-4} alquila)$_2$, C_6-C_{10} arila não substituída, C_6-C_{10} arila substituída por 1 a 5 átomos de halo e -O-(C_{1-4} haloalquila);

R^d é C_1-C_4 alquila;

R^m é ciano; e

X, Y e Z são cada um independentemente N ou C, em que a valência de qualquer átomo de carbono é preenchida conforme necessário com átomos de hidrogênio.

47. Método de acordo com a reivindicação 45, **caracterizado** pelo fato de que:

R^a é hidrogênio;

R^b é -CH_2CH_2-R^c;

R^c é selecionado a partir do grupo que consiste em: fenila não substituída, fenila substituída, indolila e -C(=O)NH_2;

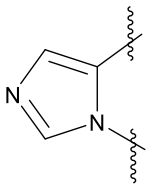
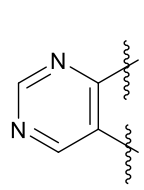
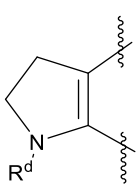
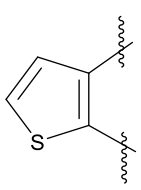
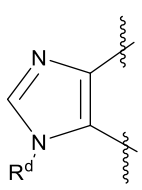
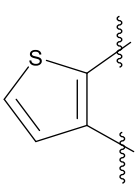
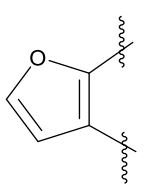
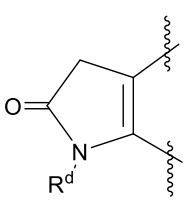
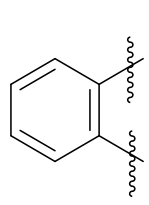
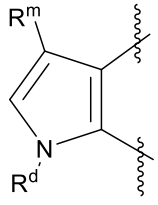
R^K é selecionado a partir do grupo que consiste em: hidrogênio, metila, piridinila substituída, benzotiofenila não substituída e -NH(C_1-C_4 alquila);

R^G é -CH_2CH_2-C(=O)NH_2;

R^Y é -NH(C_1-C_4 alquila);

R^Z é ausente ou hidrogênio;

ou R^Y e R^Z tomados em conjunto com os átomos aos quais eles estão ligados são unidos para formar um anel selecionado a partir de:

, , , , , , , , , e ; em que o dito anel é opcionalmente substituído por um, dois ou três grupos independentemente selecionados a partir de C_1-C_4 alquila, -N(C_1-C_4 alquila)$_2$, ciano, fenila não substituída e fenila substituída por 1 a 5 átomos halo;

R^d é C_1-C_4 alquila;

R^m é ciano; e

X é N ou CH.

48. Método de acordo com a reivindicação 45, **caracterizado** pelo fato de que:

R^a é hidrogênio;

R^b é -CH_2CH_2-R^c;

R^c é selecionado a partir do grupo que consiste em: fenila não substituída, fenila substituída, indolila e -C(=O)NH_2; em que a fenila substituída é substituída por um substituinte E, em que E é -OH;

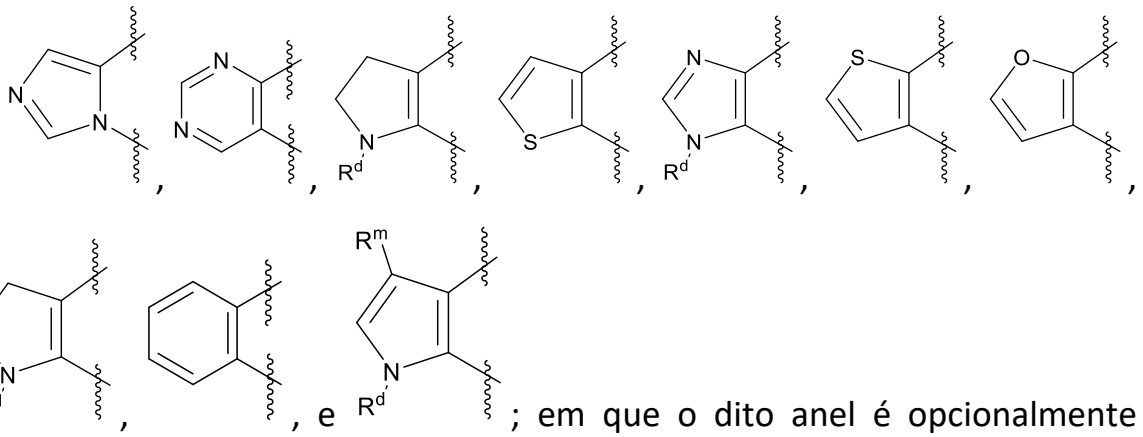
R^K é selecionado a partir do grupo que consiste em: hidrogênio, metila, piridinila substituída, benzotiofenila não substituída e -NH (*sec*-butila); em que a porção piridinila substituída é substituída por um substituinte Q, em que Q é selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{1-4} alquila, halo e ciano;

R^G é -CH_2CH_2-C(=O)NH_2;

R^Y é -NH(isopropila) ou -NH(*sec*-butila);

R^Z é ausente ou hidrogênio;

ou R^Y e R^Z tomados em conjunto com os átomos aos quais eles estão ligados são unidos para formar um anel selecionado a partir de:



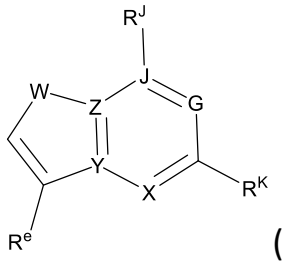
; em que o dito anel é opcionalmente substituído por um, dois ou três grupos independentemente selecionados de C_1-C_4 alquila, ciano, fenila não substituída e 4-fluorofenila;

R^d é isopropila;

R^m é ciano; e

X é N ou CH.

49. Método de acordo com a reivindicação 45, **caracterizado** pelo fato de que o composto de Fórmula (I) tem a estrutura de Fórmula (I-A):



(I-A)

incluindo sais farmaceuticamente aceitáveis do mesmo, em que:

R^J é $–NR^aR^b$;

R^a é hidrogênio ou C_1-C_4 alquila;

R^b é R^c ou -(C_1-C_4 alquil)-R^c;

R^c é selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{6-10} arila; C_{6-10} arila substituída; heteroarila não substituída de cinco a dez membros tendo 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco

a dez membros substituída por 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção R^c indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes E, em que cada E é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila);

R^K é selecionado a partir do grupo que consiste em: hidrogênio, C_{1-6} alquila não substituída; -NH(C_{1-4} alquila); -N(C_{1-4} alquila)$_2$, C_{6-10} arila não substituída; C_{6-10} arila substituída; heteroarila não substituída de cinco a dez membros tendo 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído por 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção R^K indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes Q, em que cada Q é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila), e -O-(C_{1-4} haloalquila);

Y e Z são cada um C;

X é N ou CH;

W é O ou S; e

R^e é hidrogênio ou C_1-C_4 alquila.

50. Método de acordo com a reivindicação 49, **caracterizado** pelo fato de que:

R^a é hidrogênio;

R^b é -(C_1-C_4 alquil)-R^c;

R^c é selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{6-10} arila não substituída; C_{6-10} arila substituída; heteroarila não substituída de cinco a dez membros tendo 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituída por 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção R^c indicada como

substituída é substituída por um ou mais substituintes E, em que cada E é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila);

R^K é selecionado a partir do grupo que consiste em: heteroarila não substituída de cinco a dez membros tendo 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituído por 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que a heteroarila substituída é substituída por um ou mais substituintes Q, em que cada Q é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila) e -O-(C_{1-4} haloalquila); e

R^e é C_1-C_4 alquila.

51. Método de acordo com a reivindicação 49, **caracterizado** pelo fato de que:

R^a é hidrogênio;

R^b é -(CH_2-CH_2)-R^c;

R^c é selecionado a partir do grupo que consiste em: fenila substituída e indolila não substituída; em que a fenila substituída é substituída por um substituinte E, em que E é -OH;

R^K é selecionado a partir do grupo que consiste em: benzotiofenila não substituída e piridinila substituída; em que a piridinila substituída é substituída por um substituinte Q, em que Q é selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{1-4} alquila, halo e ciano; e

R^e é isopropila.

52. Método de acordo com a reivindicação 49, **caracterizado** pelo fato de que o composto é selecionado a partir do grupo que consiste em, ou um sal farmaceuticamente aceitável de:

N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-7-isopropil-2-(5-metilpiridin-3-il)tieno[3,2-*d*]pirimidin-4-amina;

5-(4-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)-7-isopropiltieno[3,2-*d*]pirimidin-2-il)nicotinonitrila;

N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-7-isopropiltieno[3,2-*d*]pirimidin-4-amina;

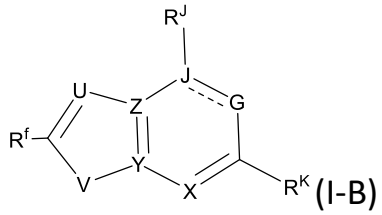
4-(2-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-7-isopropiltieno[3,2-*d*]pirimidin-4-il)amino)etil) fenol;

N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-fluoropiridin-3-il) furo [3,2-*d*]pirimidin-4-amina;

N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-metilpiridin-3-il)furo[3,2-*d*]pirimidin-4-amina; e

5-(4-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)furo[3,2-*d*]pirimidin-2-il)nicotinonitrila.

53. Método de acordo com a reivindicação 45, **caracterizado** pelo fato de que o composto de Fórmula (I) tem a estrutura de Fórmula (I-B):



(I-B)

incluindo sais farmaceuticamente aceitáveis do mesmo, em que:

R^a é hidrogênio ou C_1-C_4 alquila;

R^b é R^c ou -(C_1-$_4$ alquil)-R^c;

R^c é selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, -O(C_1-C_4 alquila), -O(C_1-C_4 haloalquila); -C(=O)NH_2; C_{6-10} arila não substituída; C_{6-10} arila substituída; heteroarila não substituída de cinco a dez membros possuindo 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituída por 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção R^c indicada como substituída é substituída por um

ou mais substituintes E, em que cada E é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila);

R^K é selecionado a partir do grupo que consiste em: hidrogênio, C_{1-6} alquila não substituída; C_{1-6} alquila substituída; -NH(C_{1-4} alquila); -N(C_{1-4} alquila)$_2$, C_{6-10} arila não substituída; C_{6-10} arila substituída; heteroarila não substituída de cinco a dez membros tendo 1 a 4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituída por 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção R^K indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes Q, em que cada Q é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila), e -O-(C_{1-4} haloalquila);

R^G é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, C_{1-4} alquila, e -(C_{1-4} alquil)-C(=O)NH_2;

R^f é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, C_{1-4} alquila, C_6-C_{10} arila não substituída, e C_6-C_{10} arila substituída por 1 a 5 átomos halo;

U é N ou CR^U;

V é S ou NR^V;

R^U é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, C_{1-4} alquila, halo, e ciano;

R^V é hidrogênio ou C_1-C_4 alquila;

em que quando U for CR^U e V for NR^V, R^U será selecionado a partir do grupo que consiste em C_{1-4} alquila, halo, e ciano;

Y e Z são cada um C; e

X é N ou CH.

54. Método de acordo com a reivindicação 53, **caracterizado** pelo fato de que:

R^a é hidrogênio;

R^b é -(C_{1-4} alquil)-R^c;

R^c é selecionado a partir do grupo que consiste em: -C(=O)NH_2, C_{6-10} arila não substituída; C_{6-10} arila substituída; heteroarila não substituída de cinco a dez membros tendo 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituída por 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção R^c indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes E, em que cada E é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila);

R^K é selecionado a partir do grupo que consiste em: heteroarila não substituída de cinco a dez membros tendo 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituída por 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que a heteroarila substituída é substituída por um ou mais substituintes Q, em que cada Q é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila) e -O-(C_{1-4} haloalquila);

R^G é C_{1-4} alquila ou -(C_{1-4} alquil)-C(=O)NH_2;

R^f é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, fenila não substituída e fenila substituída por 1 a 5 átomos de halo;

Y e Z são cada um C; e

X é CH.

55. Método de acordo com a reivindicação 53, **caracterizado** pelo fato de que:

R^a é hidrogênio;

R^b é -(CH_2-CH_2)-R^c;

R^c é selecionado a partir do grupo que consiste em: -C(=O)NH_2, fenila substituída e indolila não substituída; em que a fenila substituída é substituída por um substituinte E, em que E é -OH;

R^K é selecionado a partir do grupo que consiste em: benzotiofenila não substituída e piridinila substituída; em que a piridinila substituída é substituída por um substituinte Q, em que Q é selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{1-4} alquila, halo e ciano;

R^G é -(CH_2CH_2)-C(=O)NH_2;

R^f é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, fenila e fluorofenila;

Y e Z são cada um C; e

X é CH.

56. Método de acordo com a reivindicação 53, **caracterizado** pelo fato de que o composto é selecionado a partir do grupo que consiste em, ou um sal farmaceuticamente aceitável de:

3-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-9-isopropil-9*H*-purin-6-il) óxi) propanamida;

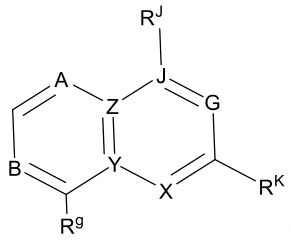
3-(2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-9-isopropil-6-oxo-6,9-di-hidro-1^H-purin-1-il) propanamida;

2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-4-((4-hidroxifenetil)amino)-7-isopropil-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina-5-carbonitrila;

N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-metil-6-feniltieno [2,3-*d*]pirimidin-4-amina; e

N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina.

57. Método de acordo com a reivindicação 45, **caracterizado** pelo fato de que o composto de Fórmula (I) tem a estrutura de Fórmula (I-C):



(I-C)

incluindo sais farmaceuticamente aceitáveis do mesmo, em que:

R^J é $–NR^aR^b$;

R^a é hidrogênio ou C_1-C_4 alquila;

R^b é R^c ou -(C_1-C_4 alquil)-R^c;

R^c é selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{6-10} arila não substituída; C_{6-10} arila substituída; heteroarila não substituída de cinco a dez membros tendo 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituída por 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção R^c indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes E, em que cada E é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila);

R^K é selecionado a partir do grupo que consiste em: hidrogênio, C_{1-6} alquila não substituída; -NH(C_{1-4} alquila); -N(C_{1-4} alquila)$_2$, C_{6-10} arila não substituída; C_{6-10} arila substituída; heteroarila não substituída de cinco a dez membros tendo de 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituída por 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção R^K indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes Q, em que cada Q é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila), e -O-(C_{1-4} haloalquila);

A é N ou CH;

B é N ou CH;

R^g é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, C_{1-4} alquila, e -N(C_{1-4} alquila)$_2$;

Y e Z são cada um C; e

X é N ou CH.

58. Método de acordo com a reivindicação 57, **caracterizado** pelo fato de que:

R^a é hidrogênio;

R^b é -(C_1-C_4 alquil)-R^c;

R^c é selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{6-10} arila não substituída; C_{6-10} arila substituída; heteroarila não substituída de cinco a dez membros tendo de 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituída por 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção R^c indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes E, em que cada E é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila);

R^K é selecionado a partir do grupo que consiste em: -NH(C_{1-4} alquila); heteroarila não substituída de cinco a dez membros tendo de 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituída por 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que a heteroarila substituída é substituída por um ou mais substituintes Q, em que cada Q é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila) e -O-(C_{1-4} haloalquila); e

R^g é hidrogênio ou -N(C_{1-4} alquila)$_2$.

59. Método de acordo com a reivindicação 57, **caracterizado** pelo fato de que:

R^a é hidrogênio;

R^b é -(C_1-C_4 alquil)-R^c;

R^c é selecionado a partir do grupo que consiste em: fenila substituída e indolila não substituída; em que a fenila substituída é substituída por um ou mais substituintes E, em que cada E é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila);

R^K é selecionado a partir do grupo que consiste em: -NH(C_{1-4} alquila); benzotiofenila não substituída; e piridinila substituída; em que a piridinila substituída é substituída por um ou mais substituintes Q, em que cada Q é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila), e -O-(C_{1-4} haloalquila); e

R^g é hidrogênio ou -N(C_{1-4} alquila)$_2$.

60. Método de acordo com a reivindicação 57, **caracterizado** pelo fato de que:

R^a é hidrogênio;

R^b é -(CH_2CH_2)-R^c;

R^c é selecionado a partir do grupo que consiste em: fenila substituída e indolila não substituída; em que a fenila substituída é substituída por um substituinte E, em que E é -OH;

R^K é selecionado a partir do grupo que consiste em: -NH (*sec*-butila); benzotioenila não substituída e piridinila substituída; em que a piridinila substituída é substituída por um ou mais substituintes Q, em que cada Q é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{1-4} alquila, halo e ciano; e

R^g é hidrogênio ou -N(CH_3)$_2$.

61. Método de acordo com a reivindicação 57, **caracterizado** pelo fato de

que o composto é selecionado a partir do grupo que consiste em, ou um sal farmaceuticamente aceitável de:

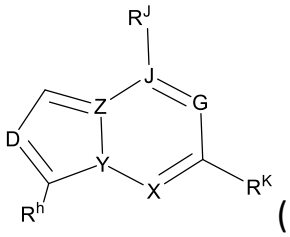
4-(2-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-8-(dimetilamino)pirimido[5,4-*d*]pirimidin-4-il)amino)etil) fenol;

N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-2-(5-fluoropiridin-3-il) quinazolin-4-amina;

5-(4-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino) quinazolin-2-il)nicotinonitrila; e

N^4-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-N^2-(sec-butil)quinazolina-2,4-diamina.

62. Método de acordo com a reivindicação 45, **caracterizado** pelo fato de que o composto de Fórmula (I) tem a estrutura de Fórmula (I-D):



(I-D)

incluindo sais farmaceuticamente aceitáveis do mesmo, em que:

R^J é $–NR^aR^b$,

R^a é hidrogênio ou C_1-C_4 alquila;

R^b é R^c ou -(C_1-$_4$ alquil)-R^c;

R^c é selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{6-10} arila não substituída; C_{6-10} arila substituída; heteroarila não substituída de cinco a dez membros tendo 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituída por 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção R^c indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes E, em que cada E é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila);

R^K é selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{6-10} arila não substituída; C_{6-10} arila substituída; heteroarila de cinco a dez membros não

substituída tendo de 1 a 4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste em O, N, e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituída tendo de 1 a 4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste em O, N, e S; em que uma fração R^K indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes Q, em que cada Q é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila), e -O-(C_{1-4} haloalquila);

R^h é hidrogênio ou C_{1-4} alquila;

D é N ou CH;

Y é N;

Z é C; e

X é N ou CH.

63. Método de acordo com a reivindicação 62, **caracterizado** pelo fato de que:

R^a é hidrogênio;

R^b é -(C_{1-4} alquil)-R^c;

R^c é selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{6-10} arila não substituída; C_{6-10} arila substituída; heteroarila não substituída de cinco a dez membros tendo 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituída por 1 a 4 átomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S; em que uma porção R^c indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes E, em que cada E é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila);

R^K é selecionado a partir do grupo que consiste em: C_{6-10} arila não substituída; C_{6-10} arila substituída; heteroarila de cinco a dez membros não substituída tendo de 1 a 4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste

em O, N, e S; e heteroarila de cinco a dez membros substituída tendo de 1 a 4 átomos selecionados a partir do grupo que consiste em O, N, e S; em que uma fração R^K indicada como substituída é substituída por um ou mais substituintes Q, em que cada Q é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_{1-4} alquila, C_{1-4} haloalquila, halo, ciano, -O-(C_{1-4} alquila), e -O-(C_{1-4} haloalquila); e

R^h é hidrogênio ou C_{1-4} alquila.

64. Método de acordo com a reivindicação 62, **caracterizado** pelo fato de que:

R^a é hidrogênio;

R^b é -(C_1-C_4 alquil)-R^c;

R^c é selecionado a partir do grupo que consiste em: fenila substituída e indolila não substituída; em que a fenila substituída é substituída por um ou mais substituintes E, em que cada E é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em: -OH, C_1-C_4 alquila, C_1-C_4 haloalquila, -O(C_1-C_4 alquila), e -O(C_1-C_4 haloalquila);

R^K é benzotiofenila não substituída; e

R^h é hidrogênio ou C_{1-4} alquila.

65. Método de acordo com a reivindicação 62, **caracterizado** pelo fato de que:

R^a é hidrogênio;

R^b é -(CH_2-CH_2)-R^c;

R^c é selecionado a partir do grupo que consiste em: fenila substituída e indolila não substituída; em que a fenila substituída é substituída por um substituinte E, em que E é -OH;

R^K é benzotiofenila não substituída; e

R^h é hidrogênio ou C_{1-4} alquila.

66. Método de acordo com a reivindicação 62, **caracterizado** pelo fato de que o composto é selecionado a partir do grupo que consiste em, ou um sal farmaceuticamente aceitável de:

N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-6-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-3-isopropilimidazo[1,5-*a*]pirazin-8-amina; e

4-(2-((6-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-3-isopropilimidazo[1,5-*a*]pirazin-8-il)amino)etil) fenol.

67. Método de acordo com a reivindicação 65, **caracterizado** pelo fato de que o composto é selecionado a partir do grupo que consiste em, ou um sal farmaceuticamente aceitável de:

5-(2-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)-6-(*sec*-butilamino)pirimidin-4-il)nicotinonitrila;

4-(2-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-6-(isopropilamino) pirimidin-4-il)amino)etil) fenol;

4-(2-((2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-7-isopropil-6,7-di-hidro-5*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino)etil)fenol; e

2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-4-((4-hidroxifenetil)amino)-7-isopropil-5,7-di-hidro-6*H*-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-ona.

68. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 67, **caracterizado** pelo fato de que o dito primeiro meio não compreende LMWH.

69. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 68, **caracterizado** pelo fato de que o dito primeiro meio não compreende uma glicosaminoglicana dessulfatada.

70. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 69, **caracterizado** pelo fato de que o dito primeiro meio compreende cada um de Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF e GM-CSF.

71. População de células *natural killer*, **caracterizada** pelo fato de que é

produzida pelo método definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 70.

72. População de células ILC3, **caracterizada** pelo fato de que é produzida pelo método definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 70.

73. Método para suprimir a proliferação de células tumorais, **caracterizado** pelo fato de que compreende o contato das células tumorais com uma pluralidade de células *natural killer* e/ou células ILC3, em que as células *natural killer* são produzidas pelo método definido na reivindicação 70.

74. Método de acordo com a reivindicação 73, **caracterizado** pelo fato de que o dito contato ocorre *in vitro*.

75. Método de acordo com a reivindicação 74, **caracterizado** pelo fato de que o dito contato ocorre *in vivo*.

76. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 73 a 75, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células tumorais são células de leucemia mieloide aguda (AML).

77. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 73 a 75, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células tumorais são células de câncer de mama, células de câncer de cabeça e pescoço ou células de sarcoma.

78. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 73 a 75, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células tumorais são células de carcinoma dutal primário, células de leucemia, células de leucemia de células T agudas, células de linfoma mieloide crônico (CML), células de leucemia mieloide crônica (CML), células de carcinoma de pulmão, células de adenocarcinoma de cólon, células de linfoma histiocítico, células de carcinoma colorretal, células de adenocarcinoma colorretal ou células de retinoblastoma.

79. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 73 a 75, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células tumorais são células tumorais sólidas.

80. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 73 a 75, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células tumorais são células tumorais hepáticas.

81. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 73 a 75, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células tumorais são células tumorais de pulmão.

82. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 73 a 75, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células tumorais são células tumorais pancreáticas.

83. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 73 a 75, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células tumorais são células tumorais renais.

84. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 73 a 75, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células tumorais são células de glioblastoma multiforme (GBM).

85. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 73 a 84, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células *natural killer* foram criopreservadas antes do dito contato ou da dita administração.

86. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 73 a 84, **caracterizado** pelo fato de que as ditas células *natural killer* não foram criopreservadas antes do dito contato ou da dita administração.

87. Célula *natural killer*, **caracterizada** pelo fato de que tem como característica a expressão de um ou mais marcadores selecionados do grupo que consiste em FGFBP2, GZMH, CCL3L3, GZMM, CXCR4, ZEB2, KLF2, LITAF, RORA, LYAR, CNOT1, IFNG, DUSP2, ATG2A, CD7, PMAIP1, PPP2R5C, NR4A2, ZFP36L2, PIK3R1, KLRF1, SNHG9, MT2A, RGS2, CHD1, DUSP1, EML4, ZFP36, ZC3H12A, DNAJB6, SBDS, IRF1, TSC22D3, TSPYL2, PNRC1, ISCA1, JUNB, WHAMM, RICTOR,

TNFAIP3, EPC1, MVD, CLK1, ARL4C, REL, KMT2E, YPEL5, AMD1, BTG2, e IDS que é inferior à expressão dos ditos marcadores em células *natural killer* de sangue periférico e/ou expressão de um ou mais marcadores selecionados do grupo que consiste em NDFIP2, LINC00996, MAL, CCL1, MB, SPINK2, C15orf48, CAMK1, KLRC1, TNFSF10, TNFRSF18, IL32, CAPG, AC092580.4, S100A11, TNFRSF4, ENO1, FCER1G, CCND2, KRT81, MRPS6, ANXA2, PTGER2, GLO1, HAVCR2, PYCARD, LAT2, SLC16A3, COTL1, PKM, TALDO1, CD96, NCR3, KRT86, STMN1, LTB, ARPC1B, ARPC5, FKBP1A, TIMP1, GZMK, CD59, PGK1, RGS10, EVL, RAC2, LGALS1, ITGB7, TUBB, PGAM1, PRF1, GZMB, IL2RB, KLRC2 e KLRB1 que é maior do que a expressão dos ditos marcadores em células *natural killer* de sangue periférico.

88. Célula *natural killer* de acordo com a reivindicação 87, **caracterizada** pelo fato de que tem como característica a expressão de um ou mais marcadores selecionados do grupo que consiste em FGFBP2, GZMH, CCL3L3, GZMM, CXCR4, ZEB2, KLF2, LITAF, RORA, LYAR, CNOT1, IFNG, DUSP2, ATG2A, CD7, PMAIP1, PPP2R5C, NR4A2, ZFP36L2, PIK3R1, KLRF1, SNHG9, MT2A, RGS2, CHD1, DUSP1, EML4, ZFP36, ZC3H12A, DNAJB6, SBDS, IRF1, TSC22D3, TSPYL2, PNRC1, ISCA1, JUNB, WHAMM, RICTOR, TNFAIP3, EPC1, MVD, CLK1, ARL4C, REL, KMT2E, YPEL5, AMD1, BTG2 e IDS que é inferior à expressão dos ditos marcadores em células *natural killer* do sangue periférico.

89. Célula *natural killer* de acordo com a reivindicação 87 ou 88, **caracterizada** pelo fato de que a expressão de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais marcadores selecionados do grupo que consiste em FGFBP2, GZMH, CCL3L3, GZMM, CXCR4, ZEB2, KLF2, LITAF, RORA, LYAR, CNOT1, IFNG, DUSP2, ATG2A, CD7, PMAIP1, PPP2R5C, NR4A2, ZFP36L2, PIK3R1, KLRF1, SNHG9, MT2A, RGS2, CHD1, DUSP1, EML4, ZFP36, ZC3H12A, DNAJB6, SBDS, IRF1, TSC22D3, TSPYL2, PNRC1, ISCA1, JUNB, WHAMM, RICTOR, TNFAIP3, EPC1, MVD, CLK1, ARL4C, REL, KMT2E, YPEL5, AMD1, BTG2 e IDS é inferior à expressão dos ditos marcadores

nas células *natural killer* do sangue periférico.

90. Célula *natural killer* de acordo com a reivindicação 87, **caracterizada** pelo fato de que tem como característica a expressão de um ou mais marcadores selecionados do grupo que consiste em NDFIP2, LINC00996, MAL, CCL1, MB, SPINK2, C15orf48, CAMK1, KLRC1, TNFSF10, TNFRSF18, IL32, CAPG, AC092580.4, S100A11, TNFRSF4, ENO1, FCER1G, CCND2, KRT81, MRPS6, ANXA2, PTGER2, GLO1, HAVCR2, PYCARD, LAT2, SLC16A3, COTL1, PKM, TALDO1, CD96, NCR3, KRT86, STMN1, LTB, ARPC1B, ARPC5, FKBP1A, TIMP1, GZMK, CD59, PGK1, RGS10, EVL, RAC2, LGALS1, ITGB7, TUBB, PGAM1, PRF1, GZMB, IL2RB, KLRC2 e KLRB1 que é superior à expressão dos ditos marcadores em células *natural killer* do sangue periférico.

91. Célula natural *killer* de acordo com qualquer uma das reivindicações 87 a 90, **caracterizada** pelo fato de que a expressão de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais marcadores selecionados do grupo que consiste em NDFIP2, LINC00996, MAL, CCL1, MB, SPINK2, C15orf48, CAMK1, KLRC1, TNFSF10, TNFRSF18, IL32, CAPG, AC092580.4, S100A11, TNFRSF4, ENO1, FCER1G, CCND2, KRT81, MRPS6, ANXA2, PTGER2, GLO1, HAVCR2, PYCARD, LAT2, SLC16A3, COTL1, PKM, TALDO1, CD96, NCR3, KRT86, STMN1, LTB, ARPC1B, ARPC5, FKBP1A, TIMP1, GZMK, CD59, PGK1, RGS10, EVL, RAC2, LGALS1, ITGB7, TUBB, PGAM1, PRF1, GZMB, IL2RB, KLRC2 e KLRB1 é maior do que a expressão dos ditos marcadores em células *natural killer* de sangue periférico.

92. Célula *natural killer* de acordo com qualquer uma das reivindicações 87 a 91, **caracterizada** pelo fato de que as células *natural killer* são células *natural killer* derivadas de células-tronco hematopoiéticas.

93. Célula *natural killer* de acordo com qualquer uma das reivindicações 87 a 92, **caracterizada** pelo fato de que as células *natural killer* são células *natural killer* derivadas de células-tronco hematopoiéticas CD34+.

94. Célula *natural killer* de acordo com a reivindicação 92 ou 93, **caracterizada** pelo fato de que as células-tronco hematopoiéticas são células-tronco hematopoiéticas derivadas da placenta.

95. Célula *natural killer* de acordo com qualquer uma das reivindicações 87 a 94, **caracterizada** pelo fato de que as células *natural killer* são preparadas pelo método definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 70.

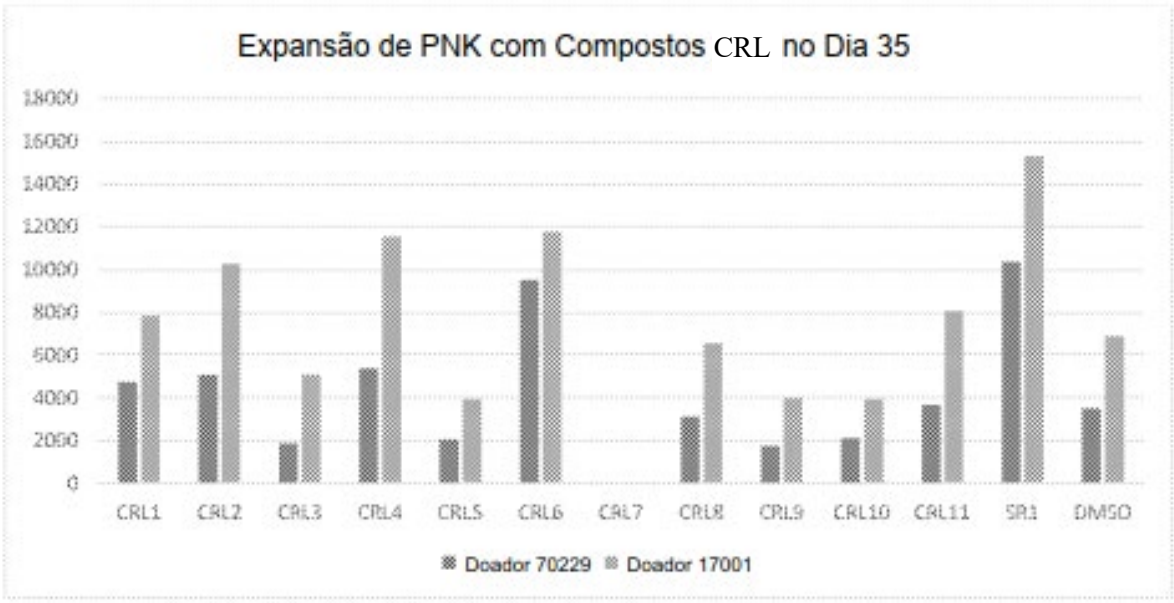

Expansão de PNK com Compostos CRL no Dia 35
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
CRL1
CRL2
CRL3
CRL4
CRL5
CRL6
CRL7
CRL8
CRL9
CRL10
CRL11
SR1
DMSO
Doador 70229
Doador 17001

FIG. 1

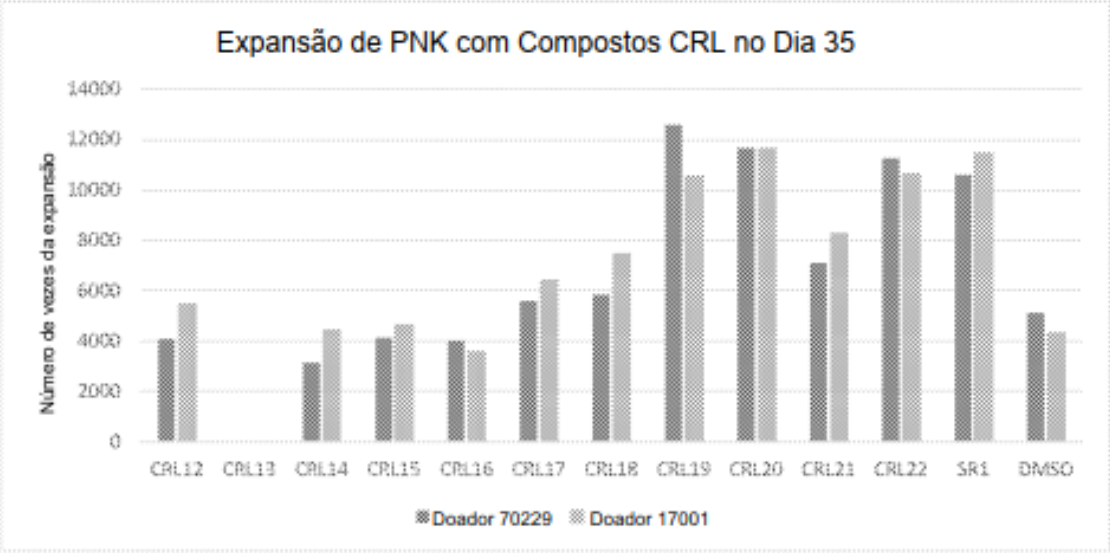

Expansão de PNK com Compostos CRL no Dia 35
Número de vezes da expansão
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
CRL12
CRL13
CRL14
CRL15
CRL16
CRL17
CRL18
CRL19
CRL20
CRL21
CRL22
SR1
DMSO
Doador 70229
Doador 17001

FIG. 2

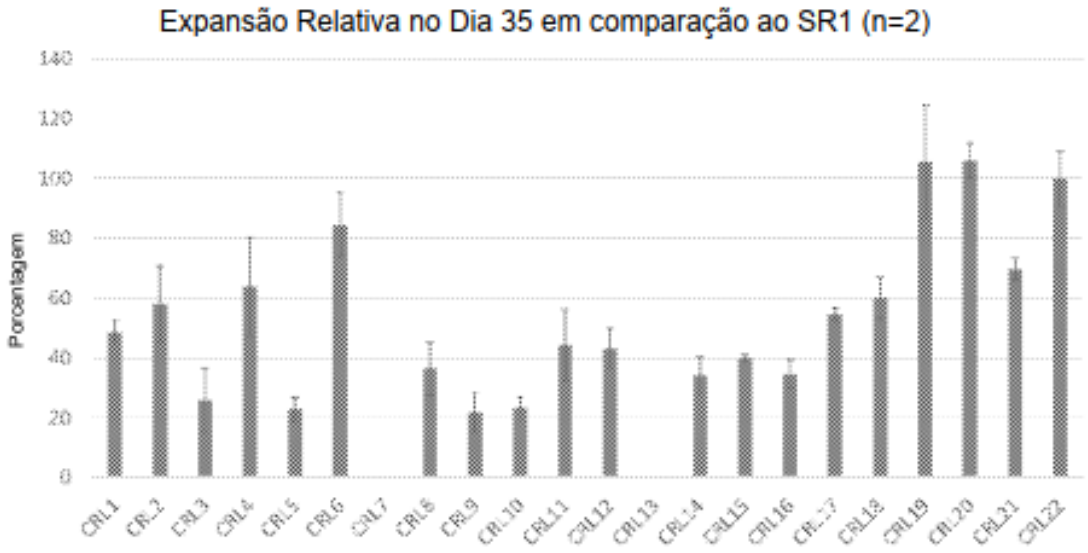

Expansão Relativa no Dia 35 em comparação ao SR1 (n=2)
Porcentagem
140
120
100
80
60
40
20
0
CRL1
CRL2
CRL3
CRL4
CRL5
CRL6
CRL7
CRL8
CRL9
CRL10
CRL11
CRL12
CRL13
CRL14
CRL15
CRL16
CRL17
CRL18
CRL19
CRL20
CRL21
CRL22

FIG. 3


Expansão Relativa no Dia 35 em comparação ao SR1 (n=2)
Porcentagem
140
120
100
80
60
40
20
0
CRL1
CRL2
CRL3
CRL4
CRL5
CRL6
CRL7
CRL8
CRL9
CRL10
CRL11
CRL12
CRL13
CRL14
CRL15
CRL16
CRL17
CRL18
CRL19
CRL20
CRL21
CRL22

FIG. 4

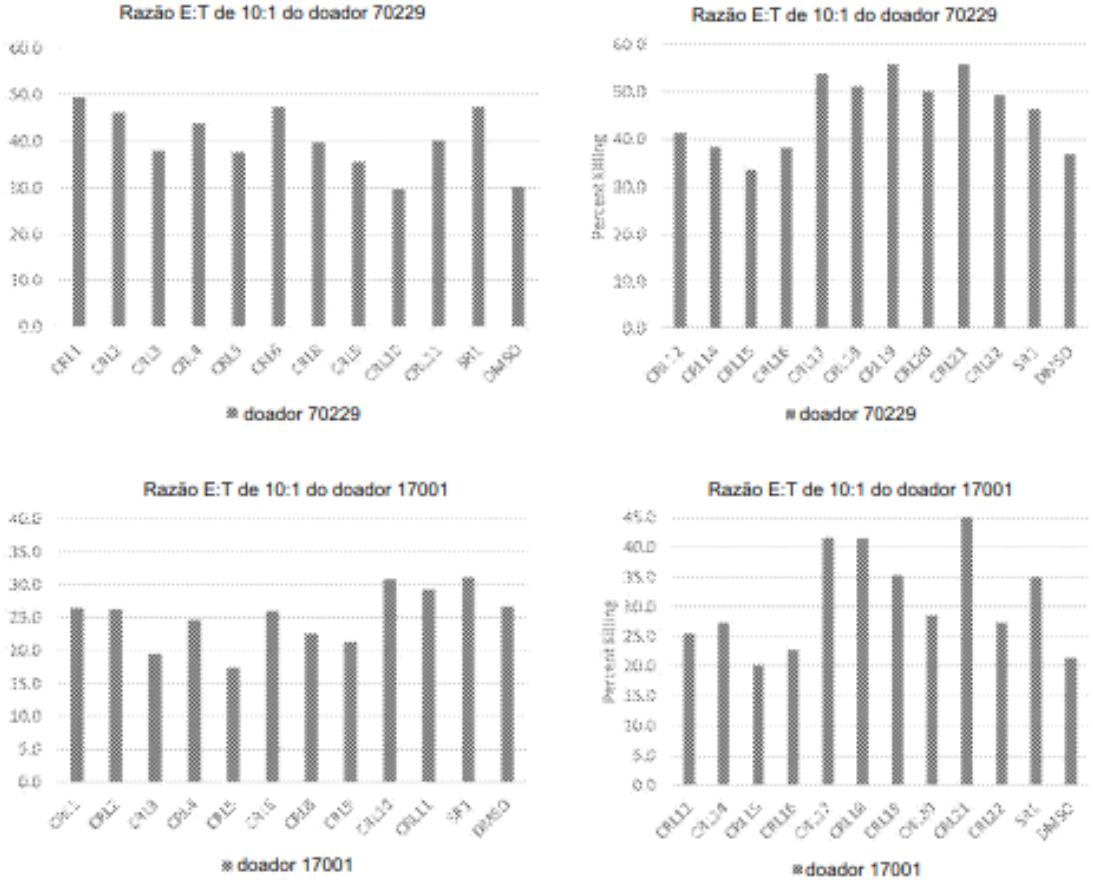

Razão E:T de 10:1 do doador 70229
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
CRL1
CRL2
CRL3
CRL4
CRL5
CRL6
CRL8
CRL9
CRL10
CRL11
SK1
DMSO
doador 70229
Razão E:T de 10:1 do doador 70229
Percent killing
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
CRL12
CRL14
CRL15
CRL16
CRL17
CRL18
CRL19
CRL20
CRL21
CRL22
SK1
DMSO
doador 70229
Razão E:T de 10:1 do doador 17001
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
CRL1
CRL2
CRL3
CRL4
CRL5
CRL6
CRL8
CRL9
CRL10
CRL11
SK1
DMSO
doador 17001
Razão E:T de 10:1 do doador 17001
Percent killing
45.0
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
CRL12
CRL14
CRL15
CRL16
CRL17
CRL18
CRL19
CRL20
CRL21
CRL22
SK1
DMSO
doador 17001

FIG. 5

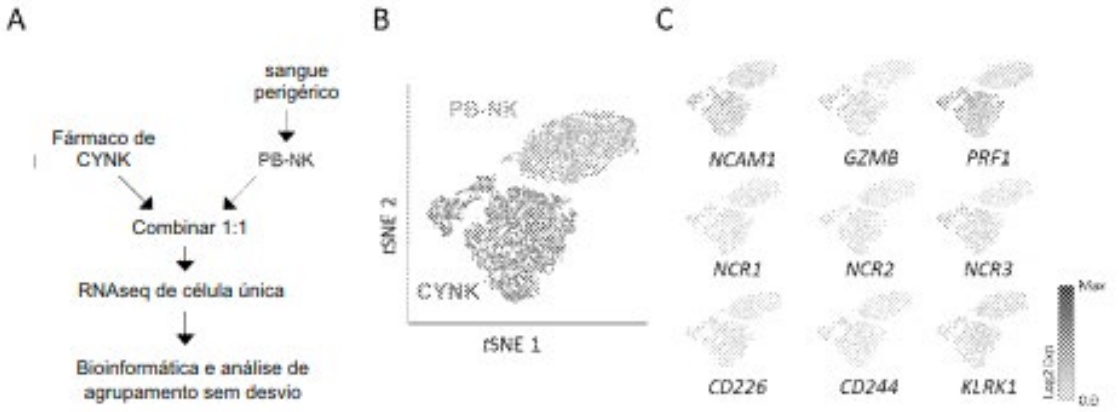

A
sangue periférico
Fármaco de CYNK
PB-NK
Combinar 1:1
RNAseq de célula única
Bioinformática e análise de agrupamento sem desvio
B
PB-NK
CYNK
tSNE 2
tSNE 1
C
NCAM1
GZMB
PRF1
NCR1
NCR2
NCR3
CD226
CD244
KLRK1
Max
0.0

FIG. 6

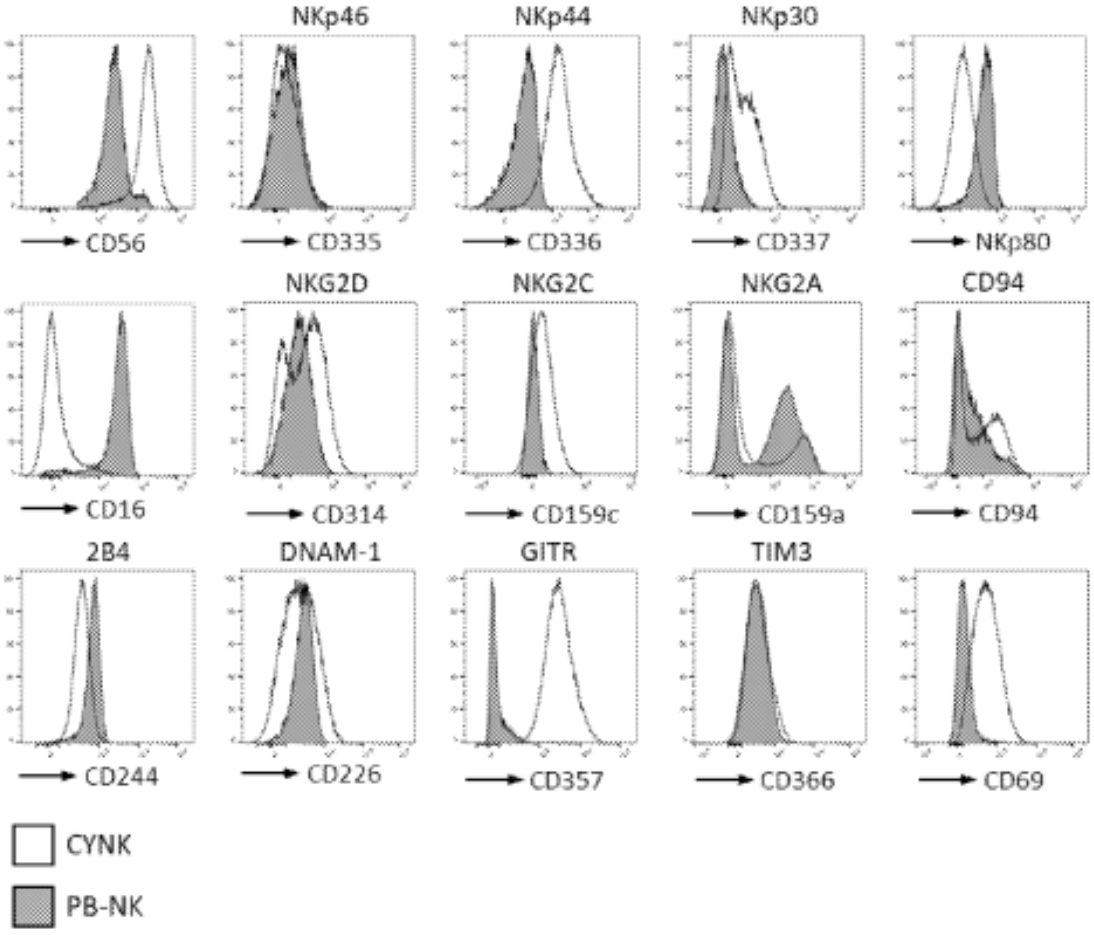

NKp46
NKp44
NKp30
CD56
CD335
CD336
CD337
NKp80
NKG2D
NKG2C
NKG2A
CD94
CD16
CD314
CD159c
CD159a
CD94
2B4
DNAM-1
GITR
TIM3
CD244
CD226
CD357
CD366
CD69
CYNK
PB-NK

FIG. 7

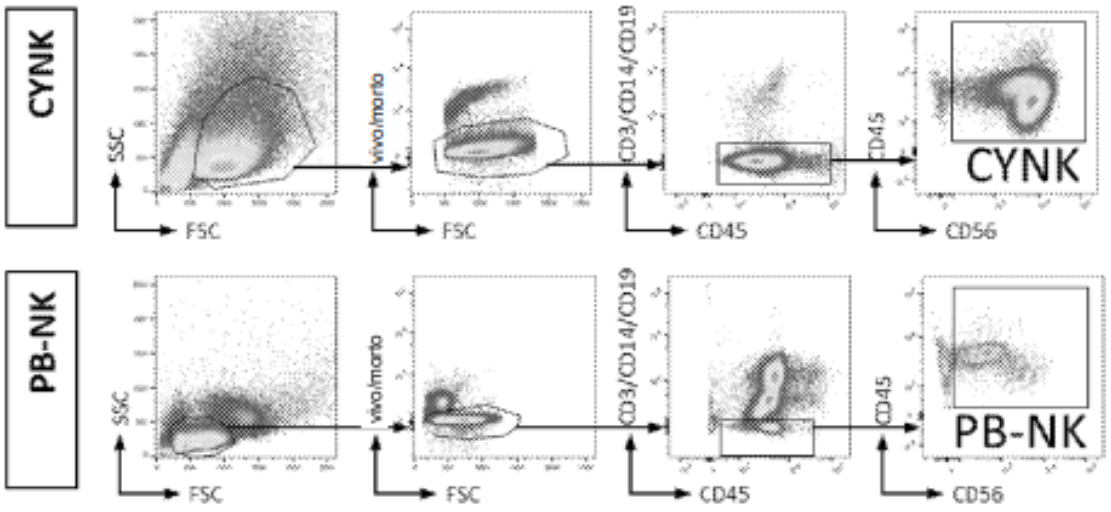

CYNK
SSC
FSC
vivo/morto
FSC
CD3/CD14/CD19
CD45
CD45
CD56
CYNK
PB-NK
SSC
FSC
vivo/morto
FSC
CD3/CD14/CD19
CD45
CD45
CD56
PB-NK

FIG. 8

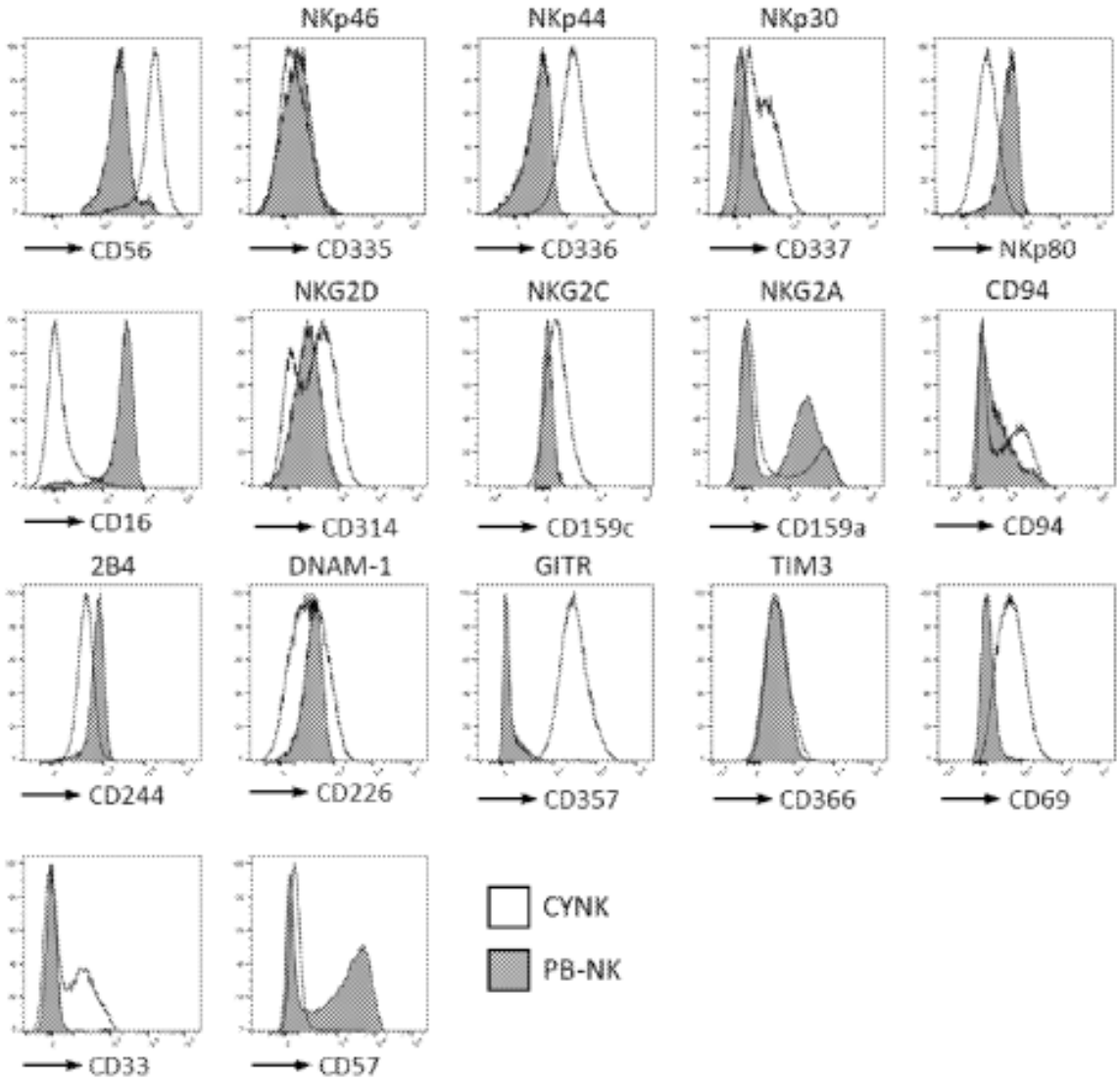

NKp46
NKp44
NKp30
CD56
CD335
CD336
CD337
NKp80
NKG2D
NKG2C
NKG2A
CD94
CD16
CD314
CD159c
CD159a
CD94
2B4
DNAM-1
GITR
TIM3
CD244
CD226
CD357
CD366
CD69
CD33
CD57
CYNK
PB-NK

FIG. 9

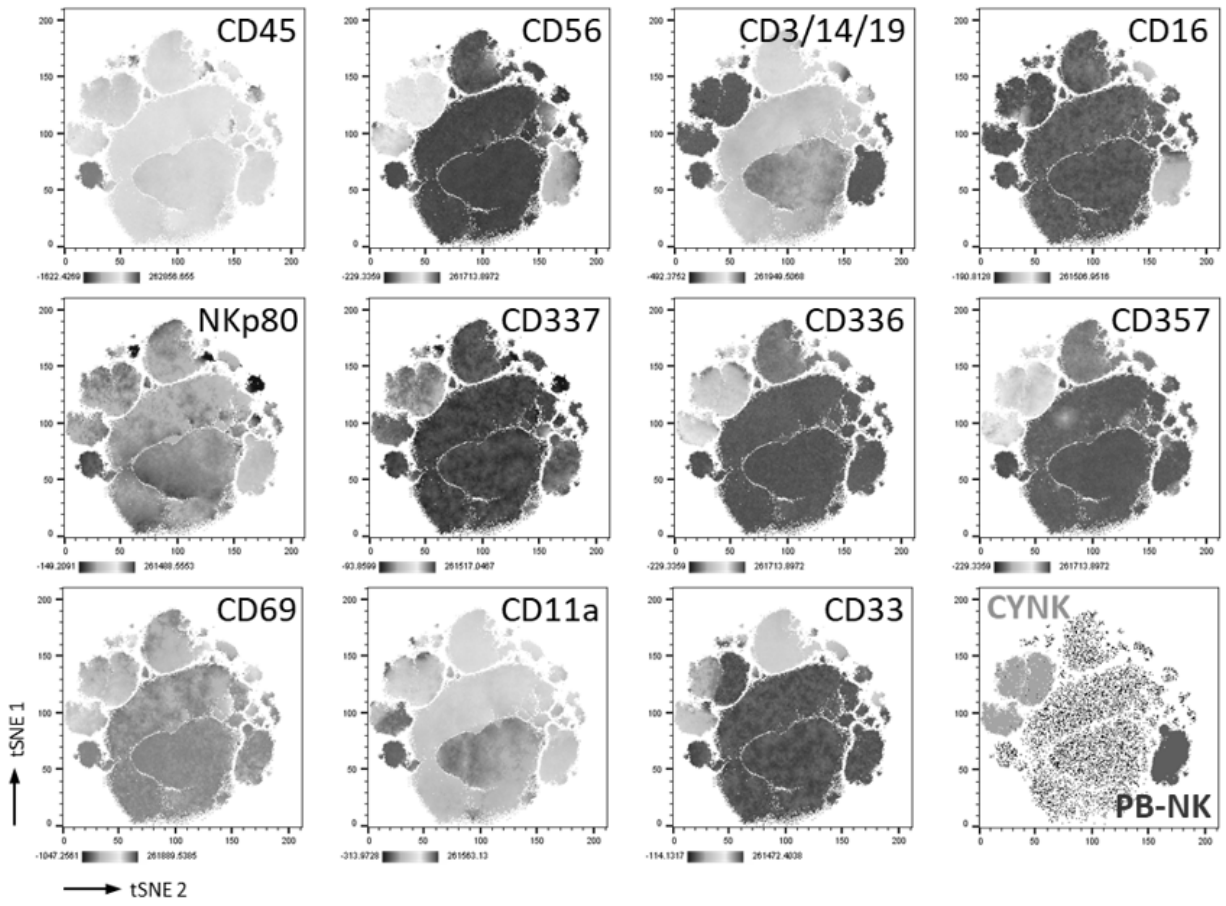

CD45
CD56
CD3/14/19
CD16
NKp80
CD337
CD336
CD357
CD69
CD11a
CD33
CYNK
PB-NK
tSNE 1
tSNE 2

FIG. 10

RESUMO

EXPANSÃO DE CÉLULAS *NATURAL KILLER* E CÉLULAS ILC3 COM NOVOS COMPOSTOS AROMÁTICOS

São fornecidos neste documento métodos de produção de células *natural killer* (NK) e / ou células ILC3 usando um método de expansão e diferenciação de três estágios com meios compreendendo fatores de mobilização de células-tronco. Também são fornecidos neste documento métodos de suprimir a proliferação de células tumorais usando as células NK e / ou células ILC3 e as populações de células NK e / ou células ILC3 produzidas pelos métodos de três estágios descritos neste documento, bem como métodos de tratamento de indivíduos com câncer ou uma infecção viral, compreendendo a administração das células NK e / ou células ILC3 e as populações de células NK e / ou células ILC3 produzidas pelos métodos de três estágios descritos neste documento a um indivíduo com câncer ou infecção viral.