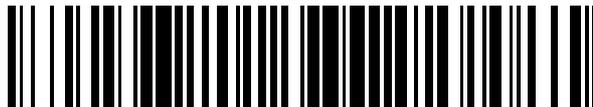


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 995**

51 Int. Cl.:

A61K 35/50 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2008** **E 08834753 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014** **EP 2203176**

54 Título: **Supresión de tumor usando perfusato placentario humano y células asesinas naturales intermediarias que provienen de placenta humana**

30 Prioridad:

28.09.2007 US 995763 P

20.08.2008 US 90555 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.03.2015

73 Titular/es:

ANTHROGENESIS CORPORATION (100.0%)
7 Powder Horn Drive
Warren, NJ 07059, US

72 Inventor/es:

ZHANG, XIAOKUI;
VOSKINARIAN-BERSE, VANESSA A.;
KANG, LIN;
PADLIYA, NEERAV DILIP;
HARIRI, ROBERT;
HEIDARAN, MOHAMMAD A.;
PAL, AJAI y
ZEITLIN, ANDREW

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 530 995 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Supresión de tumor usando perfusato placentario humano y células asesinas naturales intermediarias que provienen de placenta humana

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Nro. 60/995,763, presentada el 28 de septiembre de 2008, y la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Nro. 61/090,555, presentada el 21 de agosto de 2008.

1. Campo de la invención

10 Se divulgan en este documento métodos para suprimir el crecimiento o la proliferación de células tumorales mediante contactar las células tumorales con perfusato placentario, células derivadas de perfusato placentario, células asesinas naturales de la placenta, p. ej., del perfusato placentario, y/o células asesinas naturales combinadas que comprenden células asesinas naturales de la placenta, p. ej., del perfusato placentario y células asesinas naturales de la sangre del cordón umbilical. También se divulgan en la presente métodos para producir una población única de células asesinas naturales de la placenta, p. ej., del perfusato placentario, p. ej., perfusato placentario humana. Se divulgan además en la presente métodos de uso del perfusato placentario, y las células asesinas naturales obtenidas de allí, para suprimir la proliferación de células tumorales.

2. Antecedentes de la invención

20 El perfusato placentario comprende una colección de células placentarias obtenidas mediante el pasaje de una solución de perfusión a través de la vasculatura de la placenta, y la colección del fluido de la perfusión de la vasculatura, de la superficie materna de la placenta o de ambos. Los métodos para producir la perfusión de las placentas de los mamíferos se describen, p. ej., en la Patente de Estados Unidos Nro. 7.045.146 y la Patente de Estados Unidos Nro. 7.255.879. La población de células placentarias obtenidas por perfusión es heterogénea, comprendiendo células hematopoyéticas (CD34⁺), células nucleadas tales como granulocitos, monocitos y macrófagos, un porcentaje pequeño (menos de 1 %) de células madre de placenta adherentes al sustrato de cultivo de tejidos, y células asesinas naturales. Nadie hasta la fecha ha descrito el uso del perfusato placentario, o las poblaciones de células placentarias del perfusato, en la supresión de la proliferación de células tumorales.

30 Las células asesinas naturales (NK) son linfocitos citotóxicos que constituyen un componente principal del sistema inmunológico innato. Las células NK no expresan los receptores de antígenos de células T (TCR), CD3 o el receptor de células B de inmunoglobulinas de superficie (Ig), pero normalmente expresan los marcadores de superficie CD16 (FcγRIII) y CD56 en los seres humanos. Las células NK son citotóxicas; los gránulos pequeños en su citoplasma contienen proteínas especiales tales como perforina y proteasas conocidas como granzimas. Tras la liberación en cercana proximidad a una célula seleccionada para matar, la perforina forma poros en la membrana celular de la célula diana a través de los cuales las granzimas y las moléculas asociadas pueden ingresar, induciendo la apoptosis. Una granzima, la granzima B (también conocida como granzima 2 y esterasa de serina asociada con los linfocitos T citotóxicos 1), es una proteasa de serina crucial para la rápida inducción de la apoptosis de células diana en la respuesta inmunológica mediada por células.

35 Las células NK se activan como respuesta a los interferones o citoquinas derivadas de macrófagos. Las células NK activadas se mencionan como células asesinas activadas por linfocinas (LAK). Las células NK poseen dos tipos de receptores de la superficie, marcados como "receptores de activación" y "receptores de inhibición," que controlan la actividad citotóxica de las células.

40 El uso de una composición que comprende extracto de tejidos derivado de placenta o células CD34⁺ de la sangre del cordón umbilical o de tejido placentario para inducir la diferenciación de células con cáncer en células de malignidad reducida, o que carecen de malignidad se divulga en la Publicación de Patente de Estados Unidos Nro. 2007/0041954.

45 La Publicación de Patente de Estados Unidos Nro. 2003/068306 se refiere a un medio y a un método para expandir las células asesinas naturales que expresan el fenotipo CD56⁺CD3⁺, en donde las células asesinas naturales pueden obtenerse de cualquier fuente comercial, preferentemente de sangre periférica, médula ósea, sangre del cordón umbilical, líneas celulares o sangre periférica estimulada por citoquinas.

50 Takahashi E. et al, 2007, Scandinavian Journal of Immunology 65, 126-138, describe el uso de diferentes citoquinas para la inducción de citotoxicidad antitumoral de células asesinas naturales CD16⁺CD56^{brigh}t obtenidas de la sangre periférica.

Roussev R. G. et al, 1993, Journal of Reproductive Immunology 25: 15-29, se refiere a la caracterización fenotípica de leucocitos mononucleares de placenta humana normal.

55 Entre otras actividades, las células NK cumplen una función en el rechazo del huésped de los tumores. Dado que las células con cáncer tienen reducida o ninguna expresión de MHC clase I, se han convertido en blanco de las células NK. Los datos clínicos acumulados sugieren que el trasplante haploidéntico de las células NK humanas aisladas de

PBMC o médula ósea media potentes efectos anti-leucémicos sin poseer la enfermedad de huésped versus injerto detectable (GVHD). Véase Ruggeri et al, Science 295:2097-2100 (2002)). Las células asesinas naturales pueden activarse mediante células que carecen de, o que muestran niveles reducidos de, proteínas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC). Las células NK y las células LAK activadas y expandidas se han utilizado tanto en la terapia ex vivo como en el tratamiento in vivo de pacientes que tienen cáncer en estado avanzado, con cierto éxito contra las enfermedades relacionadas con la médula ósea, tales como leucemia; cáncer de mama; y ciertos tipos de linfoma. El tratamiento con células LAK requiere que el paciente reciba primero IL-2, seguido de leucoferesis y luego una incubación ex vivo y cultivo de las células sanguíneas autólogas cosechadas en presencia de IL-2 durante algunos días. Las células LAK deben volver a infundirse con dosis relativamente altas de IL-2 para completar la terapia. Este tratamiento de purga es costoso y puede producir efectos colaterales adversos. Estos incluyen retención de líquidos, edema pulmonar, caída en la presión arterial, fiebre alta.

A pesar de las propiedades ventajosas de las células NK en la matanza de células tumorales y células infectadas con virus, continúa siendo difícil trabajar con ellas y aplicarlas en la terapia inmunológica, principalmente debido a la dificultad de mantener sus capacidades orientadas al tumor y tumoricidas durante el cultivo y la expansión. Así, existe una necesidad en la técnica de lograr un amplio suministro de células asesinas naturales.

La presente invención se refiere a células nucleadas humanas de perfusato placentario para utilizar en un método para el tratamiento de un tumor en un individuo, en donde las células nucleadas humanas de perfusato placentario comprenden células asesinas naturales intermedias placentarias CD56⁺, CD16⁺ y son susceptibles de obtenerse mediante la perfusión de una placenta humana que se ha drenado de la sangre del cordón y enjuagado para eliminar sangre residual para producir el perfusato placentario que comprende las células placentarias nucleadas; y el aislamiento de las células placentarias nucleadas de dicho perfusato placentario.

La presente invención se refiere además a células asesinas naturales intermediarias placentarias humanas CD56⁺, CD16⁺ para utilizar en un método para el tratamiento de un tumor en un individuo, en donde dichas células asesinas naturales intermediarias placentarias expresan uno o más de los microARNs hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618 o hsa-miR-99a, a un nivel detectablemente más alto que las células asesinas naturales de la sangre periférica.

Finalmente, la presente invención se refiere a células asesinas naturales combinadas para usar en un método de tratamiento de un tumor en un individuo, en donde dichas células asesinas naturales combinadas comprenden células asesinas naturales intermediarias placentarias humanas CD56⁺, CD16⁺ aisladas de perfusato placentario y células asesinas naturales aisladas de la sangre del cordón umbilical y en donde dicha sangre del cordón umbilical se aísla de la placenta de la cual se obtiene dicho perfusato placentario, en donde dichas células asesinas naturales intermediarias placentarias expresan uno o más de los microARNs hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618 o hsa-miR-99a, a un nivel detectablemente más alto que las células asesinas naturales de la sangre periférica.

3. Compendio de la invención

Se proporciona en este documento el uso del perfusato placentario; las células del perfusato placentario, p. ej., células nucleadas totales del perfusato placentario; combinaciones de las células del perfusato placentario y células de sangre periférica; y/o células asesinas naturales de la placenta, p. ej., células asesinas naturales del perfusato placentario o células asesinas naturales obtenidas mediante la digestión de tejido placentario, para suprimir la proliferación de células tumorales, en donde las células de perfusato placentario humanas comprenden células asesinas naturales intermediarias placentarias CD56⁺, CD16⁻.

En un aspecto, se proporciona en la presente un método de supresión de la proliferación de una célula tumoral, o la población de células tumorales, que comprende contactar la célula tumoral o la población de células tumorales con perfusato placentario humana, en donde las células de perfusato placentario humanas comprenden células asesinas naturales intermediarias placentarias CD56⁺, CD16⁻. En una forma de realización específica de este método, la célula tumoral es una célula sanguínea con cáncer. En otra forma de realización específica, las células tumorales son células sanguíneas con cáncer. En otra forma de realización específica, la célula tumoral es una célula con un tumor sólido. En otra forma de realización específica, las células tumorales una célula con un tumor sólido. En otra forma de realización, la célula tumoral es una célula de carcinoma ductal primaria, una célula con leucemia, una célula con leucemia de células T agudas, una célula de linfoma mieloide crónico (CML), una célula de leucemia mielógena aguda, una célula de leucemia mielógena crónica (CML), una célula de carcinoma de pulmón, una célula de adenocarcinoma de colon, una célula de linfoma histiocítico, una célula de mieloma múltiple, una célula de retinoblastoma, una célula de carcinoma colo-rectal, o una célula de adenocarcinoma colo-rectal. En otra forma de realización específica, dicho contacto tiene lugar in vitro. En otra forma de realización específica, dicho contacto tiene lugar in vivo. En una forma de realización más específica, dicho contacto in vivo tiene lugar en un ser humano.

En otra forma de realización específica, dicho perfusato placentario humano es un perfusato que se ha pasado a través de la vasculatura de la placenta, p. ej., solamente a través de la vasculatura de la placenta. En otra forma de realización específica, dicho perfusato placentario se ha pasado a través de la vasculatura de la placenta y se recolecta de la cara materna de la placenta. En otra forma de realización específica, todas, o sustancialmente todas (p. ej., más del 90%, 95%, 98% o 99%) de las células presentes en dicho perfusato placentario son células fetales. En otra forma de realización específica, el perfusato placentario comprende células fetales y maternas. En una forma de realización más específica, las células fetales presentes en dicho perfusato placentario comprenden menos de alrededor del 90%, 80%, 70%, 60% o 50% de las células presentes en dicho perfusato. En otra forma de realización específica, dicho perfusato se obtiene mediante el pasaje de una solución de NaCl al 0,9% a través de la vasculatura de la placenta. En otra forma de realización específica, dicho perfusato comprende un medio de cultivo. En otra forma de realización específica, dicho perfusato se ha tratado para eliminar una pluralidad de eritrocitos.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método de supresión de la proliferación de una célula tumoral o una pluralidad de células tumorales que comprende contactar la célula tumoral o una pluralidad de células tumorales con una pluralidad de las células del perfusato placentario humano en donde las células de perfusato placentario humanas comprenden células asesinas naturales intermediarias placentarias CD56⁺, CD16⁻. En otra forma de realización específica, dicha pluralidad de las células del perfusato placentario son, o comprenden, células nucleadas totales del perfusato placentario. En otra forma de realización específica, dicho perfusato placentario o las células del perfusato placentario, p. ej., células nucleadas totales del perfusato placentario, se han tratado para eliminar al menos un tipo de célula. En otra forma de realización específica, dicho contacto tiene lugar in vitro. En otra forma de realización específica, dicho contacto tiene lugar in vivo. En una forma de realización más específica, dicho contacto in vivo tiene lugar en un mamífero, p. ej., un ser humano. De acuerdo con la invención, dichas células del perfusato placentario se han tratado para enriquecer las células asesinas naturales CD56⁺CD16⁻, p. ej., las células asesinas naturales intermediarias placentarias (PINK), p. ej., obtenidas de las células del perfusato placentario o células placentarias obtenidas mediante separación mecánica o enzimática del tejido placentario. En otra forma de realización específica, dichas células CD56⁺ CD16⁻ se seleccionan mediante micro perlas conjugadas con CD56. En otra forma de realización específica, dichas células CD56⁺ CD16⁻ comprenden células que exhiben expresión detectablemente inferior de NKG2D, NKp46 o CD94 que un número equivalente de células asesinas naturales CD56⁺CD16⁺. En otra forma de realización específica, las células PINK son CD3⁻. En una forma de realización más específica, al menos 50% de las células presentes en dichas células del perfusato son dichas células CD56⁺ CD16⁻. En una forma de realización más específica, en donde las células CD56⁺ CD16⁻ son al menos un 50% de dichas células del perfusato placentario, la célula tumoral es una célula de carcinoma ductal primaria, una célula con leucemia, una célula con leucemia de células T agudas, una célula de linfoma mielóide crónico (CML), una célula de leucemia mielógena aguda, una célula de leucemia mielógena crónica (CML), una célula de carcinoma de pulmón, una célula de adenocarcinoma de colon, una célula de linfoma histiocítico, una célula de mieloma múltiple, una célula de retinoblastoma, una célula de carcinoma colo-rectal o una célula de adenocarcinoma colo-rectal. En formas de realización específicas, dicho contacto es contacto in vitro. En otra forma de realización, dicho contacto es contacto in vivo, p. ej., en un mamífero, p. ej., un ser humano.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método de supresión de la proliferación de una célula tumoral o una pluralidad de células tumorales que comprende contactar la célula tumoral o una pluralidad de células tumorales con una pluralidad de células asesinas naturales CD56⁺ CD16⁻ de la placenta, p. ej., las células PINK. En una forma de realización específica, las células asesinas naturales de la placenta son células asesinas naturales obtenidas del perfusato placentario humano. En otra forma de realización específica, las células asesinas naturales son células asesinas naturales obtenidas por alteración física y/o digestión enzimática de tejido placentario. En otra forma de realización específica, dichas células asesinas naturales se seleccionan, p. ej., de las células del perfusato placentario o las células obtenidas por alteración física y/o digestión enzimática de tejido placentario, mediante micro perlas conjugadas con CD56. En otra forma de realización específica, las células asesinas naturales son CD3⁻. En una forma de realización específica, la pluralidad de células asesinas naturales es al menos el 80% de las células presentes en una población de células que comprenden las células asesinas naturales. En otra forma de realización específica, dicho contacto tiene lugar in vitro. En otra forma de realización específica, dicho contacto tiene lugar in vivo. En una forma de realización más específica, dicho contacto in vivo tiene lugar en un mamífero, p. ej., un ser humano.

En otra forma de realización específica del método, dicha pluralidad de células asesinas naturales humanas CD56⁺ CD16⁻ comprende células que exhiben expresión detectablemente más baja de NKG2D, NKp46 o CD94 que un número equivalente de células asesinas naturales CD56⁺CD16⁺. En otra forma de realización específica, dicha pluralidad de células asesinas naturales, p. ej., las células PINK, expresa uno o más de los microARNs hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618, y/o hsa-miR-99a a un nivel detectablemente más alto que las células asesinas naturales de la sangre periférica.

En otra forma de realización específica, dicha pluralidad de células asesinas naturales humanas CD56⁺ CD16⁻, p. ej., las células PINK, se contactan con un compuesto modulador inmunológico en una cantidad y durante un tiempo suficiente para que dicha pluralidad de células asesinas naturales exprese detectablemente más granzima B que un

- número equivalente de dichas células asesinas naturales que no se contactan con dicho compuesto modulador inmunológico. En una forma de realización más específica, dicho compuesto modulador inmunológico es lenalidomida o pomalidomida. En otra forma de realización específica, dicha pluralidad de células asesinas naturales, p. ej., las células PINK, se contactan con un compuesto modulador inmunológico en una cantidad y durante un tiempo suficiente para que dichas células asesinas naturales exhiban detectablemente más citotoxicidad hacia dichas células tumorales que un número equivalente de dichas células asesinas naturales que no se contactan con dicho compuesto modulador inmunológico, p. ej., lenalidomida o pomalidomida. En otra forma de realización específica, dicha pluralidad de células asesinas naturales, p. ej., las células PINK, expresan uno o más de BAX, CCL5, CCR5, CSF2, FAS, GUSB, IL2RA, o TNFRSF18 a un nivel más alto que un número equivalente de dichas células asesinas naturales que no se contactan con dicho compuesto modulador inmunológico. En otra forma de realización específica, dicha pluralidad de células asesinas naturales, p. ej., las células PINK, expresan uno o más de ACTB, BAX, CCL2, CCL3, CCL5, CCR5, CSF1, CSF2, ECEI, FAS, GNLY, GUSB, GZMB, ILIA, IL2RA, IL8, ILIO, LTA, PRFI, PTGS2, SKI, y TBX21 a un nivel más alto que un número equivalente de dichas células asesinas naturales que no se contactan con dicho compuesto modulador inmunológico.
- En otra forma de realización, las células asesinas naturales humanas CD56⁺ CD16⁻ de la placenta se combinan con células asesinas naturales de otra fuente, p. ej., la sangre de la placenta y/o la sangre del cordón umbilical, p. ej., para formar células asesinas naturales combinadas. Como se utiliza en este documento, la frase "célula(s) asesina(s) natural(es) de la placenta" no incluye células asesinas naturales de la sangre del cordón umbilical o la sangre de la placenta. En formas de realización más específicas, las células asesinas naturales de la placenta se combinan con las células asesinas naturales de otra fuente in a ratio de alrededor 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, o lo similar.
- En formas de realización específicas, las células asesinas naturales combinadas no están cultivadas, y comprenden: un número detectablemente más alto de células asesinas naturales CD3⁺CD56⁺CD16⁻ que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica; un número detectablemente más bajo de células asesinas naturales CD3⁺CD56⁺CD16⁺ que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica; un número detectablemente más alto de células asesinas naturales CD3⁺CD56⁺KIR2DL2/L3⁺ que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica; un número detectablemente más bajo de células asesinas naturales CD3⁺CD56⁺NKp46⁺ que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica; un número detectablemente más alto de células asesinas naturales CDS-CDS^o4⁺NKp30⁺ que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica; un número detectablemente más alto de células asesinas naturales CD3⁺CD56⁺2B4⁺ que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica; o un número detectablemente más alto de células asesinas naturales CD3⁺ CD56⁺CD94⁺ que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica. En otras realizaciones específicas, las células asesinas naturales combinadas están cultivadas y comprenden: un número detectablemente más bajo de CD3XD56⁺KIR2DL2/L3⁺ células asesinas naturales que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica; un número detectablemente más alto de CD3⁺CD56⁺NKp46⁺ células asesinas naturales que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica; un número detectablemente más alto de CD3XD56⁺NKp44⁺ células asesinas naturales que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica; un número detectablemente más alto de CD3⁺CD56⁺NKp30⁺ células asesinas naturales que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica.
- En una forma de realización específica de cualquiera de los métodos que anteceden, la célula tumoral es una célula con un tumor sólido. En otra forma de realización específica, la célula tumoral es una célula de un tumor líquido, p. ej., una célula de tumor de la sangre. En formas de realización más específicas, la célula tumoral es una célula de carcinoma ductal primaria, una célula con leucemia, una célula con leucemia de células T agudas, una célula de linfoma mieloide crónico (CML), una célula de leucemia mielógena aguda, una célula de leucemia mielógena crónica (CML), una célula de carcinoma de pulmón, una célula de adenocarcinoma de colon, una célula de linfoma histiocítico, una célula de mieloma múltiple, una célula de retinoblastoma, una célula de carcinoma colo-rectal o una célula de adenocarcinoma colo-rectal.
- En otro aspecto, se proporciona en la presente una composición que comprende células asesinas naturales CD56⁺, CD 16⁻ placentarias aisladas, p. ej., las células PINK. En una forma de realización específica, dichas células asesinas naturales de la placenta se aíslan del perfusato placentario humano. En otra forma de realización específica, dichas células asesinas naturales de la placenta se aíslan de la placenta por alteración física y/o digestión enzimática de tejido placentario. En otra forma de realización específica, dichas células asesinas naturales CD56⁺CD16⁻ humanas comprenden al menos 50% de las células presentes en la composición. En una forma de realización específica, dichas células asesinas naturales comprenden al menos 80% de las células presentes en la composición. Dicha composición también puede comprender células asesinas naturales aisladas CD56⁺, CD16⁺. Dichas células asesinas naturales CD56⁺, CD16⁺ pueden ser de un individuo distinto que dichas células asesinas naturales CD56⁺, CD16⁻. En otra forma de realización específica, dichas células asesinas naturales CD56⁺, CD16⁻ aisladas son de un solo individuo. En una forma de realización más específica, dichas células asesinas naturales

CD56⁺, CD 16⁻ aisladas comprenden células asesinas naturales de al menos dos individuos diferentes. En otra forma de realización específica, dichas células asesinas naturales de la placenta, p. ej., dichas células PINK, están expandidas.

5 En una forma de realización más específica, la composición comprende células asesinas naturales de la placenta y células asesinas naturales de otra fuente. En una forma de realización específica, dicha otra fuente es la sangre del cordón y/o la sangre del cordón umbilical. En otra forma de realización específica, dicha otra fuente es sangre periférica. En formas de realización más específicas, las células asesinas naturales de la placenta se combinan con células asesinas naturales de otra fuente in a ratio de alrededor 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, o lo similar.

10 En otra forma de realización específica, la composición comprende perfusato placentario aislado. En una forma de realización más específica, dicho perfusato placentario es del mismo individuo que dichas células asesinas naturales. En otra forma de realización más específica, dicho perfusato placentario comprende el perfusato placentario de un individuo distinto que dichas células asesinas naturales. En otra forma de realización específica, todas, o sustancialmente todas {p. ej., más del 90%, 95%, 98% o 99%} de las células presentes en dicho perfusato placentario son células fetales. En otra forma de realización específica, el perfusato placentario comprende células fetales y maternas. En una forma de realización más específica, las células fetales presentes en dicho perfusato placentario comprenden menos de alrededor de 90%, 80%, 70%, 60% o 50% de las células presentes en dicho perfusato. En otra forma de realización específica, dicho perfusato se obtiene mediante el pasaje de una solución de NaCl al 0,9% a través de la vasculatura de la placenta. En otra forma de realización específica, dicho perfusato comprende un medio de cultivo. En otra forma de realización específica, dicho perfusato se ha tratado para eliminar una pluralidad de eritrocitos.

15 En otra forma de realización específica, la composición comprende las células del perfusato placentario humano en donde las células de perfusato placentario humano comprenden células asesinas naturales intermedias placentarias CD56⁺, CD16⁻. En una forma de realización más específica, dichas células del perfusato placentario humano son del mismo individuo que dichas células asesinas naturales. En otra forma de realización más específica, dichas células del perfusato placentario son de un individuo distinto que dichas células asesinas naturales. En otra forma de realización específica, la composición comprende perfusato placentario aislado y las células del perfusato placentario aisladas, en donde dicho perfusato aislado y dichas células del perfusato placentario aisladas son de individuos diferentes. En otra forma de realización más específica de cualquiera de las realizaciones que anteceden que comprenden el perfusato placentario, dicho perfusato placentario comprende el perfusato placentario de al menos dos individuos. En otra forma de realización más específica de cualquiera de las realizaciones que anteceden que comprenden las células del perfusato placentario, dichas células del perfusato placentario aisladas son de al menos dos individuos. La composición puede comprender además células PINK aisladas, en donde las células PINK son de un individuo distinto que dicho perfusato placentario o dichas células de perfusato.

20 Se divulga también en la presente un método para aislar las células asesinas naturales de la placenta, que comprende obtener una pluralidad de células placentarias, y aislar las células asesinas naturales de dicha pluralidad de células placentarias. Las células placentarias son, o comprenden, las células del perfusato placentario, p. ej., células nucleadas totales del perfusato placentario. Dicha pluralidad de células placentarias pueden ser, o pueden comprender, células placentarias obtenidas mediante digestión mecánica y/o enzimática de tejido placentario. Dicho aislamiento puede realizarse mediante la utilización de uno o más anticuerpos. Dicho uno o más anticuerpos pueden comprender uno o más de los anticuerpos para CD3, CD 16 o CD56. Dicho aislamiento puede comprender aislar las células CD56⁺ de las células CD56⁻ en dicha pluralidad de células placentarias. Más específicamente, dicho aislamiento comprende aislar las células placentarias CD56⁺, CD 16⁻ de las células placentarias que son CD56⁻ o CD16⁺. Más específicamente, dicho aislamiento comprende aislar las células placentarias CD56⁺, CD 16⁻, CD3⁻ de las células placentarias que son CD56⁻, CD16⁺, o CD3⁺. Dicho método de aislar las células asesinas naturales de la placenta produce una población de células placentarias que es al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o al menos 99% de células asesinas naturales CD56⁺, CD 16⁻.

25 En ciertas formas de realización de los métodos que anteceden, las células del perfusato placentario se han expandido en cultivo. En varias formas de realización, las células se han expandido durante al menos, alrededor de, o no más 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, 28, 29 o 30 días. En una forma de realización específica, dichas células del perfusato placentario se han expandido en presencia de una fase de alimentación y/o en presencia de al menos una citoquina. En una forma de realización más específica, dicha fase de alimentación comprende células K562 o células mononucleares de sangre periférica. En otra forma de realización más específica, dicha al menos una citoquina es interleucina-2.

3.1. Definiciones

Como se utiliza en este documento, "células asesinas naturales combinadas" son células asesinas naturales, p. ej., de cordón umbilical y perfusato placentario humano combinados, en donde el perfusato placentario se obtiene de la

misma placenta que la sangre del cordón. Las células asesinas naturales de ambos se aíslan en forma separada o al mismo tiempo, y se combinan.

5 Como se utiliza en este documento, "PINK" y "células PINK" se refieren a células asesinas naturales placentarias intermedias que se obtienen de placenta humana, p. ej., perfusato placentario humana o tejido placentario que se ha separado mecánicamente y/o enzimáticamente. Las células son CD56⁺ y CD16⁺, p. ej., según se determina por citometría de flujo, p. ej., clasificación de células activadas por fluorescencia con el uso de anticuerpos para CD56 y CD 16. Las células PINK no se obtienen de la sangre del cordón o de la sangre periférica.

10 Como se utiliza en este documento, "perfusato placentario" significa solución de perfusión que se ha pasado a través de al menos parte de una placenta, p. ej., una placenta humana, p. ej., a través de la vasculatura de la placenta, incluyendo una pluralidad de células recolectadas mediante la solución de perfusión durante el pasaje a través de la placenta.

Como se utiliza en este documento, "células del perfusato placentario" significa células nucleadas, p. ej., células nucleadas totales, aisladas de, o susceptibles de aislarse de, el perfusato placentario.

15 Como se utiliza en este documento, "supresión de células tumorales," "supresión de la proliferación de células tumorales," y lo similar, incluye hacer más lento el crecimiento de una población de células tumorales, p. ej., mediante la matanza de una o más de las células tumorales en dicha población de células tumorales, por ejemplo, mediante contactar la población de células tumorales con las células PINK, a la población de células que comprenden las células PINK, células asesinas naturales combinadas, una población de células que comprenden células asesinas naturales combinadas, perfusato placentario humana, o lo similar.

20 **4. Breve descripción de las figuras**

La FIG. 1 muestra los resultados de citometría de flujo mediante la utilización de anticuerpos anti-CD3 y anticuerpos anti-CD56 para células seleccionadas mediante micro perlas de CD56 de perfusato placentario humano (HPP). La mayoría de las células aisladas son CD56⁺CD3⁻.

25 La FIG. 2 ejemplifica la producción de citoquinas mediante las células PINK y/o las células tumorales durante 24 horas de cultivo. La FIG. 2A ejemplifica la secreción de interferón gamma (IFN γ) de parte de las células asesinas naturales (PINK) intermediarias derivadas de perfusato placentario solas o en presencia de las células tumorales KG. Las células PINK y las células KG- 1a se cultivaron solas o en combinación a una proporción de 1:1. Eje Y: picogramos de IFN γ producido por los cultivos. La FIG. 2B ejemplifica la secreción del factor estimulante de colonias de macrófago-granulocito (GM-CSF) mediante las células PINK solas o en presencia de las células tumorales KG. 30 Las células PINK y las células KG-1a se cultivaron solas o en combinación a una proporción de 1:1. Eje Y: picogramos de GM-CSF producido por los cultivos.

35 La FIG. 3 ejemplifica la citotoxicidad de las células PINK a las células tumorales KG en el cultivo concomitante durante 24 horas a una proporción de 1:1, 5:1, 10:1 o 20:1 de células PINK a células tumorales. Eje X: proporción de las células PINK a las células tumorales. Eje Y: porcentaje de células tumorales muertas comparado con las células tumorales sin las células PINK.

La FIG. 4 ejemplifica la citotoxicidad de las células NK placentarias y las células NK de sangre periférica (PB) cultivadas durante 21 días hacia las células K562. Las barras de error se refieren a la desviación estándar de 4 unidades de células NK placentarias cultivadas o 3 unidades de células NK cultivadas de sangre periférica.

40 La FIG. 5 ejemplifica la citotoxicidad del perfusato placentario humano completo, según se obtiene de la placenta, a células tumorales KG-1 en el cultivo concomitante durante 24 horas a una proporción de 1:1, 5:1, 10:1 o 20:1 o 100:1 células HPP a las células tumorales. Eje X: proporción de células HPP a las células tumorales. Eje Y: porcentaje de células tumorales muertas comparado con las células tumorales sin células HPP.

45 La FIG. 6 ejemplifica la citotoxicidad del perfusato placentario humano completo, según se obtiene de la placenta, y la sangre del cordón umbilical, a las células tumorales KG en el cultivo concomitante durante 48 horas en diluciones seriales de 100:1, 50:1, 25:1, 12,5:1, 6,25:1, 3,12:1, 1,56:1 o 0,78:1 células HPP o células UCB a las células tumorales. Eje X: proporción de células HPP o células de cordón umbilical a las células tumorales. Eje Y: porcentaje de células tumorales muertas después de un tiempo de cultivo de 48 horas comparado con las células tumorales sin células HPP o células de cordón umbilical.

50 La FIG. 7 ejemplifica la citotoxicidad del perfusato placentario humano completo, según se obtiene de la placenta a las células tumorales KG en el cultivo concomitante durante 48 horas en diluciones seriales de 100:1, 50:1, 25:1, 12,5:1, 6,25:1, 3,12:1, 1,56:1 o 0,78:1 células HPP a las células tumorales. El perfusato se usó o bien como se recolectó, o se estimuló durante 24 horas con 100 U/ml o 1000 U/ml de interleucina-2 (IL-2). Eje X: proporción de células HPP a las células tumorales. Eje Y: porcentaje de células tumorales muertas después de un tiempo de cultivo de 48 horas comparado con las células tumorales sin células HPP.

La FIG. 8 ejemplifica el efecto citotóxico de perfusato placentario humana hacia un panel de líneas celulares de tumor después del cultivo con HPP o células UCB en una proporción 50:1 con las células tumorales. FIG. 8A: cultivo concomitante durante 24 horas. La FIG. 8B: cultivo concomitante durante 48 horas. Eje X: línea celular del tumor analizada. Eje Y: porcentaje de células tumorales muertas luego del cultivo concomitante, comparado con el número de células tumorales en ausencia de células tumorales.

La FIG. 9 ejemplifica la producción de IFN γ por parte de las células HPP cultivadas en forma concomitante con las células tumorales KG en proporciones diferentes de células HPP a células tumorales. Eje X: Condiciones experimentales, incluyendo la proporción de las células HPP a las células tumorales Eje Y: Niveles de IFN γ por mililitro después de 24 horas de cultivo concomitante.

FIG. 10 Producción de IFN γ por medio de células HPP o UCB en cultivo concomitante con un panel de células tumorales. Las células HPP o UCB se cultivaron en forma concomitante a una proporción de 50:1 con líneas celulares de tumor durante 24 horas (FIG. 10A) o 48 horas (FIG. 10B). Los niveles de IFN γ se determinaron mediante el ensayo Luminex (HCYTO-60K-03, Millipore). Eje X: línea celular del tumor analizada. Eje Y: picogramos de IFN γ producidos por medio de células HPP o UCB, comparado con los picogramos de IFN γ producidos en ausencia de células tumorales.

La FIG. 11 ejemplifica la reducción en el tamaño del tumor tras la administración de 2×10^7 células de perfusato placentario humana (HPP) a ratones que tienen tumores de células KG-1 de aproximadamente 332 mm^3 en volumen. Las células HPP intra-tumorales se inyectaron directamente en el sitio del tumor subcutáneo. Se administraron por vía intravenosa células HPP- IV. Sólo administración de control - vehículo. Volúmenes de tumor en mm^3 .

5. Descripción detallada

La presente invención se refiere a células de perfusato placentario nucleado humano para usar en un método para el tratamiento de un tumor en un individuo, en donde las células de perfusato placentario nucleado humano comprenden células asesinas naturales intermedias placentarias CD56 $^+$, CD16 $^-$ y se pueden obtener por perfusión de una placenta humana que se ha drenado de la sangre del cordón y enjuagado para eliminar la sangre residual para producir el perfusato placentario humano que comprende células placentarias nucleadas; y el aislamiento de las células placentarias nucleadas de dicho perfusato placentario.

La presente invención se refiere además a células asesinas naturales intermediarias placentarias humanas CD56 $^+$, CD16 $^-$ para utilizar en un método para el tratamiento de un tumor en un individuo, en donde dichas células asesinas naturales intermediarias placentarias expresan uno o más de los microARNs hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618 o hsa-miR-99a, a un nivel detectablemente más alto que las células asesinas naturales de la sangre periférica.

Finalmente, la presente invención se refiere a células asesinas naturales combinadas para usar en un método de tratamiento de un tumor en un individuo, en donde dichas células asesinas naturales combinadas comprenden células asesinas naturales intermediarias placentarias humanas CD56 $^+$, CD16 $^-$ aisladas de perfusato placentario y células asesinas naturales aisladas de la sangre del cordón umbilical y en donde dicha sangre del cordón umbilical se aísla de la placenta de la cual se obtiene dicho perfusato placentario, en donde dichas células asesinas naturales intermediarias placentarias expresan uno o más de los microARNs hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618 o hsa-miR-99a, a un nivel detectablemente más alto que las células asesinas naturales de la sangre periférica.

Se proporciona en la presente el uso del perfusato placentario, las células del perfusato placentario, y/o las células asesinas naturales derivadas de perfusato placentario ("PINK") obtenidas de la placenta para suprimir el crecimiento o la proliferación de una célula tumoral o una pluralidad de células tumorales. En particular, se proporcionan en la presente las células asesinas naturales (NK), y poblaciones de las células NK, aisladas del perfusato placentario, p. ej., perfusato placentario humana, o aisladas del tejido placentario que se ha separado mecánicamente y/o enzimáticamente, métodos para obtener las células NK, y métodos de uso de las células. Se proporcionan en la presente también poblaciones de células, p. ej., poblaciones de células placentarias, que comprenden células asesinas naturales. Métodos para obtener el perfusato placentario, y obtener células del perfusato placentario, se describen en la Sección 5.1, a continuación. Las células asesinas naturales derivadas de perfusato placentario, y métodos para obtener las células, se describen en la Sección 5.2, a continuación. Métodos de uso del perfusato placentario, células derivadas de perfusato placentario o las células asesinas naturales derivadas de perfusato placentario, p. ej., células asesinas naturales intermedias, para suprimir la proliferación de células tumorales, se describen en la Sección 5.3, a continuación.

5.1. Perfusato placentario

5.1.1. Composición de la recolección de células

El perfusato placentario, las células de perfusato y las células asesinas naturales derivadas de perfusato placentario se proporciona en la presente pueden recolectarse mediante la perfusión de la placenta de un mamífero, p. ej., la placenta posterior a un parto humano mediante la utilización de una composición placentaria de la recolección de células. El perfusato puede recolectarse de la placenta mediante la perfusión de la placenta con cualquier solución aceptable desde el punto de vista fisiológico, p. ej., una solución salina, medio de cultivo, o una composición más compleja de la recolección de células. Una composición de recolección celular apropiada para la perfusión de una placenta, y para la recolección y preservación de las células de perfusato, p. ej., las células del perfusato placentario nucleadas totales o las células PINK, se describe en detalle en la Publicación de Solicitud de Estados Unidos relacionada Nro. 2007/0190042.

La composición de recolección celular puede comprender cualquier solución aceptable desde el punto de vista fisiológico apropiada para la recolección y/o el cultivo de células madre, por ejemplo, una solución salina (p. ej., solución salina con buffer de fosfato, solución de Krebs, solución de Krebs modificada, solución de Eagle, NaCl al 0,9%. etc.), un medio de cultivo (p. ej., DMEM, H.DMEM, etc.), y lo similar.

La composición de recolección celular puede comprender uno o más componentes que tienden a preservar las células placentarias, es decir, evitar que las células placentarias se sequen, o demorar la muerte de las células placentarias, reducir el número de células placentarias en a la población de células que mueren, o lo similar, desde el momento de la recolección hasta el momento del cultivo. Dichos componentes pueden ser, p. ej., un inhibidor de apoptosis (p. ej., un inhibidor de caspasa o un inhibidor de JNK); un vasodilatador (p. ej., sulfato de magnesio, un fármaco anti-hipertensivo, péptido natriurético atrial (ANP), adrenocorticotropina, hormona liberadora de corticotropina, nitroprusida de sodio, hidralazina, trifosfato de adenosina, adenosina, indometacina o sulfato de magnesio, un inhibidor de fosfodiesterasa, etc.); un inhibidor de necrosis (p. ej., 2-(1H-Indol-3-il)-3-pentilamino-maleimida, ditiocarbamato de pirrolidina, o clonazepam); un inhibidor del TNF- α ; y/o un perfluorocarbono que transporta oxígeno (p. ej., bromuro de perfluorooctilo, bromuro de perfluorodecilo, etc.).

La composición de recolección celular puede comprender una o más enzimas que degradan los tejidos, p. ej., una metaloproteasa, una proteasa de serina, una proteasa neutra, una hialuronidasa, una RNasa, o una DNasa, o lo similar. Dichas enzimas incluyen, aunque no se limitan a, colagenasas (p. ej., colagenasa I, II, III o IV, una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, etc.); dispasa, termolisina, elastasa, tripsina, LIBERASE, hialuronidasa, y lo similar.

La composición de recolección celular puede comprender una cantidad efectiva desde el punto de vista bacteriocida o bacteriostática de un antibiótico. En ciertas formas de realización no taxativas, el antibiótico es una macrólida (p. ej., tobramicina), una cefalosporina (p. ej., cefalexina, cefradina, cefuroxima, cefprozil, cefaclor, cefixima o cefadroxil), una claritromicina, una eritromicina, una pellicilina (p. ej., penicilina V) o una quinolona (p. ej., ofloxacina, ciprofloxacina o norfloxacina), una tetraciclina, una estreptomycinina, etc. En una forma de realización particular, el antibiótico es activo contra bacterias Gram(+) y/o Gram(-), p. ej., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y lo similar.

La composición de recolección celular también puede comprender uno o más de los siguientes compuestos: adenosina (alrededor de 1 mM hasta alrededor de 50 mM); D-glucosa (alrededor de 20 mM hasta alrededor de 100 mM); iones de magnesio (alrededor de 1 mM hasta alrededor de 50 mM); una macromolécula de peso molecular de más de 20.000 daltones, en una forma de realización, presentes en una cantidad suficientes para mantener la integridad endotelial y la viabilidad celular (p. ej., un coloide natural o sintético, un polisacárido tales como dextran o un polietilenglicol presente a alrededor de 25 g/l hasta alrededor de 100 g/l, o alrededor de 40 g/l hasta alrededor de 60 g/l); un antioxidante (p. ej., hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, glutatona, vitamina C o vitamina E presente a alrededor de 25 μ M hasta alrededor de 100 μ M); un agente reductor (p. ej., N-acetilcisteína presente a alrededor de 0,1 mM hasta alrededor de 5 mM); un agente que previene la entrada de calcio en las células (p. ej., verapamil presente a alrededor de 2 μ M hasta alrededor de 25 μ M); nitroglicerina (p. ej., alrededor de 0,05 g/l hasta alrededor de 0,2 g/l); un anticoagulante, en una forma de realización, presente en una cantidad suficiente para ayudar a prevenir la coagulación de sangre residual (p. ej., heparina o hirudina presente a una concentración de alrededor de 1000 unidades/l hasta alrededor de 100.000 unidades/l); o un compuesto que contiene amilorida (p. ej., amilorida, etil isopropil amilorida, amilorida de hexametileno, dimetil amilorida o isobutil amilorida presente a alrededor de 1,0 μ M hasta alrededor de 5 μ M).

5.1.2. Recolección y manipulación de la placenta

En general, un ser humano placenta se recupera inmediatamente después de su expulsión después del parto. En una forma de realización preferida, la placenta se recupera de un paciente después del consentimiento informado y después de realizar una historia clínica completa del paciente y se asocia con la placenta. Preferentemente, la historia clínica continúa después del parto. Dicha historia clínica puede usarse para coordinar el uso posterior de la placenta o las células cosechadas de ésta. Por ejemplo, las células placentarias humanas pueden usarse, en vista

de la historia clínica, para la medicina personalizada para el bebé asociado con la placenta, o para padres, hermanos u otros parientes del bebé.

Antes de la recuperación del perfusato, la sangre del cordón umbilical y la sangre de la placenta se retiran. En ciertas formas de realización, después del parto, la sangre del cordón en la placenta se recupera. La placenta puede someterse a un proceso convencional de recuperación de la sangre del cordón. Normalmente se usa una aguja o una cánula, con la ayuda de la gravedad, para exsanguinar la placenta (véase, p. ej., Anderson, la Patente de Estados Unidos Nro. 5.372.581; Hessel et al, la Patente de Estados Unidos Nro. 5.415.665). La aguja o la cánula usualmente se colocan en la vena umbilical y la placenta puede masajearse suavemente para ayudar a drenar la sangre del cordón de la placenta. Dicha recuperación de la sangre del cordón puede realizarse a nivel comercial, p. ej., LifeBank Inc., Cedar Knolls, N. J., ViaCord, Cord Blood Registry y CryoCell. Preferentemente, la placenta se drena por gravedad sin manipulación adicional para minimizar la alteración de los tejidos durante la recuperación de la sangre del cordón.

Normalmente, a placenta se transporta desde la sala de partos hasta otra ubicación, p. ej., un laboratorio, para la recuperación de la sangre del cordón y recolección del perfusato. La placenta se transporta preferentemente en un dispositivo de transporte aislado por calor, estéril (manteniendo la temperatura de la placenta entre 20-28°C), por ejemplo, mediante colocar la placenta, con cordón umbilical proximal sujeto con grapa, en una bolsa plástica estéril tipo ziploc, que luego se coloca en un recipiente aislado. En otra forma de realización, la placenta se transporta en un kit de recolección de sangre del cordón umbilical sustancialmente como se describe en la Patente de Estados Unidos Nro. 7.147.626. Preferentemente, la placenta se envía al laboratorio cuatro a veinticuatro horas después del parto. En ciertas formas de realización, el cordón umbilical proximal se sujeta con grapa, preferentemente dentro de 4-5 cm (centímetros) de la inserción en el disco placentario antes de la recuperación de la sangre del cordón. En otras formas de realización, el cordón umbilical proximal se sujeta con grapa después de la recuperación de la sangre del cordón pero antes del procesamiento adicional de la placenta.

La placenta, antes de recolección del perfusato, puede almacenarse en condiciones estériles y o bien a temperatura ambiente o a una temperatura de 5 a 25°C (centígrado). La placenta puede almacenarse durante un período de más de cuarenta y ocho horas, y preferentemente durante un período de cuatro a veinticuatro horas antes de realizar la perfusión de la placenta para retirar cualquier sangre residual del cordón. La placenta se almacena preferentemente en una solución anticoagulante a una temperatura de 5°C a 25°C (centígrados). Las soluciones anticoagulantes apropiadas se conocen muy bien en la técnica. Por ejemplo, una solución de heparina o warfarina de sodio puede usarse. En una forma de realización preferida, la solución anticoagulante comprende una solución de heparina (p. ej., 1% p/p en solución 1:1000). La placenta exsanguinada se almacena preferentemente durante no más de 36 horas antes de recolectar el perfusato placentario.

5.1.3. Perfusión placentaria

Los métodos para producir la perfusión de placentas de mamíferos se divulgan, p. ej., en Hariri, las Patentes de Estados Unidos Nros. 7.045.148 y 7.255.879, y en la Publicación de la Solicitud de Estados Unidos Nro. 2007/0190042, titulada "Composición mejorada para recolectar y conservar órganos".

El perfusato puede obtenerse mediante el pasaje de solución de perfusión, p. ej., solución salina, medio de cultivo o composiciones de recolección de células descritas con anterioridad, a través de la vasculatura de la placenta. En una forma de realización, una placenta de mamífero se perfundiona mediante el pasaje de la solución de perfusión a través de cualquiera o de ambas de la arteria umbilical y la vena umbilical. El flujo de la solución de perfusión a través de la placenta puede lograrse con el uso de, p. ej., flujo por gravedad en la placenta. Preferentemente, la solución de perfusión se fuerza a través de la placenta mediante la utilización de una bomba, p. ej., una bomba peristáltica. La vena umbilical puede, p. ej., canularse con una cánula, p. ej., una cánula de TEFLON® o plástico, que se conecta a un aparato de conexión estéril, tales como intubación estéril. El aparato de conexión estéril se conecta a un colector de perfusión.

En la preparación para perfusión, la placenta se orienta preferentemente de manera tal que la arteria umbilical y la vena umbilical se ubican en el punto más alto de la placenta. La placenta puede perfundirse mediante el pasaje de una solución de perfusión a través de la vasculatura de la placenta, o a través de la vasculatura de la placenta y el tejido circundante. En una forma de realización, la arteria umbilical y la vena umbilical se conectan simultáneamente a una pipeta que se conecta por medio de un conector flexible a un reservorio de la solución de perfusión. La solución de perfusión se pasa en la vena y la arteria umbilical. La solución de perfusión exuda de y/o pasa a través de las paredes de los vasos sanguíneos en los tejidos circundantes de la placenta, y se recolecta en un recipiente abierto apropiado de la superficie de la placenta que se une al útero de la madre durante la gestación. La solución de perfusión también puede introducirse a través de la abertura del cordón umbilical y se deja fluir o filtrar hasta salir de las aberturas en la pared de la placenta que forma interfaz con la pared del útero de la madre. En otra forma de realización, la solución de perfusión se pasa a través de las venas umbilicales y se recolecta de la arteria umbilical, o se pasa a través de la arteria umbilical y se recolecta de las venas umbilicales, es decir, se pasa solamente a través de la vasculatura de la placenta (tejido fetal).

- En una forma de realización, por ejemplo, la arteria umbilical y la vena umbilical se conectan simultáneamente, p. ej., a una pipeta que se conecta por medio de un conector flexible a un reservorio de la solución de perfusión. La solución de perfusión se pasa en la vena y la arteria umbilical. La solución de perfusión exuda de y/o pasa a través de las paredes de los vasos sanguíneos en los tejidos circundantes de la placenta, y se recolecta en un recipiente abierto apropiado de la superficie de la placenta que se une al útero de la madre durante la gestación. La solución de perfusión también puede introducirse a través de la abertura del cordón umbilical y se deja fluir o filtrar hasta salir de las aberturas en la pared de la placenta que hace interfaz con la pared del útero de la madre. Las células placentarias que se recolectan mediante este método, que puede denominarse como un método de "sartén", son normalmente una mezcla de células fetales y maternas.
- En otra forma de realización, la solución de perfusión se pasa a través de las venas umbilicales y se recolecta de la arteria umbilical, o se pasa a través de la arteria umbilical y se recolecta de las venas umbilicales. Las células placentarias recolectadas mediante este método, que puede denominarse como un método de "circuito cerrado", normalmente son casi exclusivamente fetales.
- El método de perfusión por circuito cerrado puede, en una forma de realización, realizarse de la siguiente manera. Una placenta posterior al parto se obtiene dentro de alrededor de 48 horas después del nacimiento. El cordón umbilical se sujeta con grapa y se corta por encima de la grapa. El cordón umbilical puede descartarse, o puede procesarse para recuperar, p. ej., células madre del cordón umbilical, y/o procesar la membrana del cordón umbilical para la producción de un material biológico. La membrana amniótica puede retenerse durante la perfusión, o puede separarse del corión, p. ej., mediante la utilización de disección directa con los dedos. Si la membrana amniótica se separa del corión antes la perfusión, la misma puede, p. ej., descartarse o procesarse, p. ej., para obtener células madre mediante digestión enzimática, o para producir, p. ej., un material biológico de membrana amniótica, p. ej., el material biológico descrito en la Publicación de la Solicitud de Estados Unidos Nro. 2004/0048796. Después de limpiar la placenta de todos los coágulos de sangre visibles y sangre residual, p. ej., mediante la utilización de gasa estéril, los vasos del cordón umbilical se exponen, p. ej., mediante el corte parcial de la membrana del cordón umbilical para exponer una sección de corte transversal del cordón. Los vasos se identifican y se abren, p. ej., mediante el avance de una grapa tipo cocodrilo cerrada a través del extremo cortado de cada vaso. El aparato, p. ej., sonda plástica conectada a un dispositivo de perfusión o una bomba peristáltica, se inserta luego en cada una de las arterias de la placenta. La bomba puede ser cualquier bomba apropiada para ese fin, p. ej., una bomba peristáltica. La sonda plástica, conectada a un reservorio de recolección estéril, p. ej., una bolsa de sangre tales como una bolsa de recolección de 250 ml, luego se inserta en la vena de la placenta. Alternativamente, la sonda conectada a la bomba se inserta en la vena placentaria, y los tubos para un reservorio(s) de recolección se insertan en una o ambas de las arterias de la placenta. La placenta se perfunde luego con un volumen de solución de perfusión, p. ej., alrededor de 750 ml de solución de perfusión. Luego se recolectan las células en el perfusato, p. ej., por centrifugado.
- En una forma de realización, el cordón umbilical proximal se sujeta con grapa durante la perfusión, y más preferentemente, se sujeta con grapa dentro de 4-5 cm (centímetros) de la inserción del cordón en el disco placentario.
- La primera recolección de fluido de perfusión de una placenta de mamífero durante el proceso de exsanguinación se colorea en general con glóbulos rojos residuales de la sangre del cordón y/o la sangre de la placenta. El fluido de perfusión se torna más incoloro a medida que avanza la perfusión y las células de sangre periférica residual se eliminan por lavado de la placenta. En general desde 30 hasta 100 ml de fluido de perfusión es adecuado para enjuagar inicialmente la sangre de la placenta, pero más o menos fluido de perfusión puede usarse dependiendo de los resultados observados.
- El volumen del líquido de perfusión usado para perfundir la placenta puede variar dependiendo de la cantidad de células placentarias que se recolectará, el tamaño de la placenta, la cantidad de recolecciones que se realizarán desde una placenta individual, etc. En varias formas de realización, el volumen del líquido de perfusión puede ser desde 50 ml hasta 5000 ml, 50 ml hasta 4000 ml, 50 ml hasta 3000 ml, 100 ml hasta 2000 ml, 250 ml hasta 2000 ml, 500 ml hasta 2000 ml, o 750 ml hasta 2000 ml. Normalmente, la placenta se perfunde con 700-800 ml del líquido de perfusión luego de la exsanguinación.
- La placenta puede perfundirse una pluralidad de veces durante el transcurso de varias horas o varios días. Donde la placenta se perfundirá una pluralidad de veces, puede mantenerse o cultivarse en condiciones asépticas en un contenedor u otro recipiente apropiado, y se perfunde con una composición de la recolección de células, o una solución de perfusión estándar (p. ej., una solución salina normal tales como solución salina con buffer de fosfato ("PBS") con o sin un anticoagulante (p. ej., heparina, warfarina de sodio, cumarina, bishidroxicumarina), y/o con o sin un agente antimicrobiano (p. ej., β -mercaptoetanol (0,1 mM); antibióticos tales como estreptomina (p. ej., a 40-100 μ g/ml), penicilina (p. ej., a 40 U/ml), anfotericina B (p. ej., a 0,5 μ g/ml). En una forma de realización, una placenta aislada se mantiene o se cultiva durante un período de tiempo sin recolectar el perfusato, de manera tal que la placenta se mantiene o se cultiva durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 horas, o 2 o 3 o more días antes de la perfusión y recolección del perfusato. La placenta perfundida puede mantenerse durante uno o más momento(s) adicional(es), p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,

18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más horas, y perfundirse una segunda vez con, p. ej., 700-800 ml de fluido de perfusión. La placenta puede perfundirse 1, 2, 3, 4, 5 o más veces, por ejemplo, una vez cada 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. En una forma de realización preferida, la perfusión de la placenta y recolección de solución de perfusión, p. ej., composición de la recolección de células placentarias, se repite hasta que la cantidad de células nucleadas recuperadas cae por debajo de 100 células/ml. Los perfusatos en diferentes momentos pueden procesarse además individualmente para recuperar poblaciones de células dependientes del tiempo, p. ej., células nucleadas totales. Los perfusatos de diferentes momentos también pueden agruparse.

5.1.4. Perfusato placentario y células del perfusato placentario

El perfusato placentario comprende una recolección heterogénea de células. Normalmente, el perfusato placentario se desprovee de eritrocitos antes de usar. Dicha depleción puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos de separación de glóbulos rojos de las células nucleadas. En cierta forma de realización, el perfusato o las células de perfusato se criopreservan. En ciertas otras formas de realización, el perfusato placentario comprende, o las células de perfusato comprenden sólo células fetales, o una combinación de células fetales y células maternas.

Normalmente, el perfusato placentario de una perfusión placentaria simple comprende alrededor de 100 millones hasta alrededor de 500 millones células nucleadas. En ciertas formas de realización, el perfusato placentario o las células de perfusato comprenden células CD34⁺, p. ej., células progenitoras y madre hematopoyéticas. Dichas células pueden, en una forma de realización más específica, comprender células madre o progenitoras CD34⁺CD45⁻, células madre o progenitoras CD34⁺CD45⁺, progenitores mieloides, progenitores linfoides, y/o progenitores eritroides. En otras formas de realización, el perfusato placentario y las células del perfusato placentario comprenden células madre placentarias adherentes, p. ej., células madre CD34⁻. En otra forma de realización, el perfusato placentario y las células del perfusato placentario comprenden, p. ej., células progenitoras endoteliales, células osteoprogenitoras, y células asesinas naturales. En ciertas formas de realización, el perfusato placentario como se recolecta de la placenta y se desprovee de eritrocitos, o las células de perfusato aisladas de dicho perfusato, comprenden alrededor de 6-7% de células asesinas naturales (CD3⁻, CD56⁺); alrededor de 21-22% de células T (CD3⁺); alrededor de 6-7% de células B (CD 19⁺); alrededor de 1-2% de células progenitoras endoteliales (CD34⁺, CD31⁺); alrededor de 2-3% de células progenitoras neurales (nestin⁺); alrededor de 2-5% de células progenitoras hematopoyéticas (CD34⁺); y alrededor de 0,5-1,5% de células madre placentarias adherentes (p. ej., CD34⁻, CDI 17⁻, CDI 05⁺ y CD44⁺), según se determina, p. ej., mediante citometría de flujo, p. ej., mediante análisis FACS.

5.2. Alteración y digestión de tejido placentario para obtener las células PINK

Las células asesinas naturales de la placenta, p. ej., las células PINK, pueden obtenerse del tejido placentario que se ha separado mecánicamente y/o enzimáticamente.

El tejido placentario puede alterarse mediante la utilización de una o más enzimas que degradan los tejidos, p. ej., una metaloproteasa, una proteasa de serina, una proteasa neutra, una RNasa, o una DNasa, o lo similar. Dichas enzimas incluyen, aunque no se limitan a, colagenasas (p. ej., colagenasa I, II, III o IV, una colagenasa de Clostridium histolyticum, etc.); dispasa, termolisina, elastasa, tripsina, LIBERASE, hialuronidasa, y lo similar. Normalmente después de la digestión, el tejido digerido se pasa a través de un colador o filtro para retirar los coágulos parcialmente digeridos, dejando una suspensión sustancialmente de una sola célula.

Después de que se obtiene una suspensión de células placentarias, las células asesinas naturales pueden aislarse mediante la utilización de, p. ej., anticuerpos para CD3 y CD56. En una forma de realización específica, las células asesinas naturales de la placenta se aíslan mediante selección para determinar células que son CD56⁺ para producir una primera población de células; contactar dicha primera población de células con anticuerpos específicos para CD3 y/o CD 16; y retirar células de dicha primera población de células que son CD3⁺ o CD56⁺, produciendo de este modo una segunda población de células que es sustancialmente CD56⁺ y CD3⁻, CD56⁺ y CD16⁻, o CD56⁺, CD3⁻ y CD16⁻.

En una forma de realización, se usan perlas magnéticas para aislar células asesinas naturales de la placenta de una suspensión de células placentarias. Las células pueden aislarse, p. ej., mediante la utilización de una técnica de clasificación de células activadas magnética (MACS), un método para separar partículas en base a su capacidad de unir las perlas magnéticas (p. ej., alrededor de 0,5-100 µm de diámetro) que comprenden uno o más anticuerpos específicos, p. ej., anticuerpos anti-CD56. Una variedad de modificaciones útiles puede realizarse en las micro esferas magnéticas, incluyendo la adición covalente de anticuerpo que reconoce específicamente una molécula de la superficie celular o hapteno. Las perlas luego se mezclan con las células para permitir la unión. Las células luego se pasan a través de un campo magnético para separar las células que tienen el marcador de la superficie celular específico. En una forma de realización, estas células pueden aislarse y volver a mezclarse con perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo contra marcadores de superficie celular adicionales. Las células nuevamente se pasan a través de un campo magnético, aislando las células que se unen a ambos anticuerpos. Dichas células pueden diluirse entonces en platos separados, tales como placas de microtitulación para aislamiento clonal.

5.3. Células asesinas naturales de la placenta

En un aspecto, se proporciona en la presente el aislamiento, la caracterización, y el uso de células asesinas naturales susceptibles de obtenerse de la placenta, p. ej., del perfusato placentario y/o de tejido placentario alterado mecánicamente y/o enzimáticamente, y de composiciones que comprenden dichas células asesinas naturales. En una forma de realización específica, las células asesinas naturales de la placenta son "células asesinas naturales placentarias intermedias," o células "PINK", se caracterizan por que son CD56⁺CD16⁻, es decir, muestran el marcador celular CD56 y carecen del marcador celular CD 16, p. ej., según se determina por citometría de flujo, p. ej., clasificación de células activadas por fluorescencia mediante la utilización de anticuerpos contra CD 16 y CD56, como se describió con anterioridad. De esta manera, se proporciona en la presente células PINK aisladas y pluralidades aisladas de las células PINK. También se proporciona en la presente pluralidades de células aisladas que comprenden las células PINK CD56⁺CD16⁻ en combinación con células asesinas naturales CD56⁺CD16⁺. En formas de realización más específicas, las células asesinas naturales CD56⁺CD16⁺ pueden aislarse de la placenta, o de otra fuente, p. ej., sangre periférica, la sangre del cordón umbilical, médula ósea, o lo similar. Así, en varias otras formas de realización, las células PINK pueden combinarse con CD56⁺CD16⁺ células asesinas naturales, p. ej., en proporciones de, por ejemplo, alrededor de 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 o alrededor de 9:1. Como se usa en este contexto, "aislado" significa que las células se han retirado de su entorno normal, p. ej., la placenta.

En ciertas formas de realización, las células PINK son CD3⁻.

En otras formas de realización, las células PINK no exhiben uno o más marcadores celulares exhibidos por células asesinas naturales totalmente maduras (p. ej., CD 16), o exhiben dicho uno o más marcadores a un nivel detectablemente reducido comparado con células asesinas naturales completamente maduras, o exhibir uno o más marcadores celulares asociados con precursores de células asesinas naturales pero no células asesinas naturales completamente maduras. En una forma de realización específica, una célula PINK proporcionada en la presente expresa NKG2D, CD94 y/o NKp46 a un nivel detectablemente más bajo que una célula NK completamente madura. En otra forma de realización específica, una pluralidad de células PINK proporcionada en la presente expresa, en total, NKG2D, CD94 y/o NKp46 a un nivel detectablemente más bajo que un número equivalente de las células NK totalmente maduras.

En ciertas formas de realización, las células PINK expresan uno o más de los microARNs hsa-miR- 100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR- 518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR- 618, y/o hsa-miR-99a a un nivel detectablemente más alto que las células asesinas naturales de la sangre periférica.

[0071] En ciertas formas de realización, las células asesinas naturales de la placenta, p. ej., las células PINK, se han expandido en cultivo. En ciertas otras formas de realización, las células del perfusato placentario se han expandido en cultivo. En una forma de realización específica, dichas células del perfusato placentario se han expandido en presencia de una fase de alimentación y/o en presencia de al menos una citoquina. En una forma de realización más específica, dicha fase de alimentación comprende células K562 o células mononucleares de sangre periférica. En otra forma de realización más específica, dicha al menos una citoquina es interleucina-2.

En otra forma de realización, se proporciona en la presente una pluralidad aislada (p. ej., población) de células PINK. En otra forma de realización específica, la población aislada de células se produce mediante aislamiento por microperlas de CD56 de células del perfusato placentario. En varias formas de realización específicas, la población comprende al menos alrededor de 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o al menos alrededor de 99% de células PINK. En otra forma de realización, la pluralidad de las células PINK comprende, o consiste en, las células PINK que no se han expandido; p. ej., son como se recolecta del perfusato placentario. En otra forma de realización, la pluralidad de las células PINK comprenden, o consiste en, las células PINK que se han expandido. Los métodos para expandir células asesinas naturales se han descrito, p. ej., en Ohno et al., Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nro. 2003/0157713; véase además Yssel et al, J. Immunol. Methods 72(l):219-227 (1984) y Litwin et al., J. Exp. Med. 178(4): 1321-1326 (1993) y la descripción de la expansión de células asesinas naturales en el Ejemplo 1, a continuación.

En otras formas de realización, la pluralidad aislada de las células PINK no exhibe uno o más marcadores celulares exhibidos por las células asesinas naturales completamente maduras (p. ej., CD 16), o exhibe dicho uno o más marcadores a un nivel detectablemente reducido comparado con células asesinas naturales completamente maduras, o exhibe uno o más marcadores celulares asociados con precursores de células asesinas naturales pero no asociados con células asesinas naturales completamente maduras. En una forma de realización específica, una célula PINK se proporciona en la presente expresa NKG2D, CD94 y/o NKp46 a un nivel detectablemente más bajo que una célula NK completamente madura. En otra forma de realización específica, una pluralidad de las células PINK proporcionadas en la presente expresa, en total, NKG2D, CD94 y/o NKp46 a un nivel detectablemente más bajo que un número equivalente de las células NK totalmente maduras.

En ciertas formas de realización específicas, la población de las células PINK expresa uno o más de los microARNs hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618, y/o hsa-miR-99a a un nivel detectablemente más alto que las células asesinas naturales de la sangre periférica. En otra forma de realización específica, la población de las células PINK expresa una cantidad detectablemente más alta de granzima B que un número equivalente de las células asesinas naturales de la sangre periférica.

En otras formas de realización, las células PINK proporcionadas en la presente se han expandido en cultivo. En formas de realización específicas, las células PINK se han cultivado, p. ej., expandido en cultivo, durante al menos, alrededor de, o como máximo 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 o 28 días. En una forma de realización específica, las células PINK se cultivan durante alrededor de 21 días.

En otra forma de realización, se proporciona en la presente una la población de células aisladas, p. ej., células placentarias, que comprenden las células PINK. En una forma de realización específica, la población aislada de células es de células nucleadas totales del perfusato placentario, p. ej., las células del perfusato placentario, que comprenden células PINK aisladas, autólogas. En otra forma de realización específica, la población de células es una población de células aisladas producida por aislamiento por microperlas de CD56 de células del perfusato placentario. En varias formas de realización específicas, la población comprende al menos alrededor de 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o al menos alrededor de 99% de células PINK.

Debido a que la placenta después del parto comprende tejido y células del perfusato placentario de la madre y del feto, dependiendo del método de recolección, puede comprender células fetales solamente, o una mayoría sustancial de células fetales (p. ej., más del alrededor de 90%, 95%, 98% o 99%), o puede comprender una mezcla de células fetales y maternas (p. ej., las células fetales comprenden menos de alrededor de 90%, 80%, 70%, 60%, o 50% de células nucleadas totales del perfusato). En una forma de realización, las células PINK derivan únicamente de células fetales placentarias, p. ej., las células obtenidas de la perfusión con circuito cerrado de la placenta (véase más arriba) en donde la perfusión produce perfusato que comprende una mayoría sustancial, o únicamente, de células fetales placentarias. En otra forma de realización, las células PINK derivan de células fetales y maternas, p. ej., células obtenidas por perfusión mediante el método de sartén (véase con anterioridad), en donde el perfusato producido por perfusión que comprende una mezcla de células placentarias maternas y fetales. Así, en una forma de realización, se proporciona en la presente a la población de células asesinas naturales intermedias derivadas de la placenta, cuya mayoría sustancial tiene el genotipo fetal. En otra forma de realización, se proporciona en la presente una población de células asesinas naturales intermedias derivadas de la placenta que comprenden células asesinas naturales que tienen el genotipo fetal y células asesinas naturales que tienen el fenotipo materno.

Se proporcionan también en la presente poblaciones de células asesinas naturales intermedias derivadas de la placenta que comprenden células asesinas naturales de una fuente no placentaria. Por ejemplo, en una forma de realización, se proporciona en la presente la población de las células PINK que también comprende células asesinas naturales de la sangre del cordón umbilical, sangre periférica, médula ósea, o una combinación de dos o más de los anteriores. Las poblaciones de células asesinas naturales que comprenden las células PINK y células asesinas naturales de una fuente no placentaria puede comprender las células presentes en, p. ej., una proporción de alrededor de 1:10, 2:9, 3:8, 4:7, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, 10:1, 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, 9:1, 10:1, 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, o alrededor de 1:100, o lo similar.

Se divulgan además en la presente combinaciones de la sangre del cordón umbilical y células PINK aisladas. En varias formas de realización, el cordón umbilical se combina con las células PINK a alrededor 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 , o 5×10^8 , o más, células PINK por mililitro de sangre del cordón.

Se proporcionan también en la presente métodos de aislamiento de las células PINK. En una forma de realización, las células PINK se recolectan obteniendo el perfusato placentario, luego se contacta el perfusato placentario con una composición que se une específicamente a células CD56⁺, p. ej., un anticuerpo contra CD56, seguido de aislamiento de CD56⁺ células sobre la base de dicha unión para formar a la población de células CD56⁺. La población de células CD56⁺ comprende una población aislada de células asesinas naturales. En una forma de realización específica, CD56⁺ células se contactan con una composición que se une específicamente a las células CD16⁺, p. ej., un anticuerpo contra CD 16, y las células CD16⁺ de la población de células CD56⁺. En otra forma de realización específica, las células CD3⁺ también se excluyen de la población de células CD56⁺.

En una forma de realización, las células PINK se obtienen del perfusato placentario de la siguiente manera. La placenta humana post-parto se exsangünea y se perfunde, p. ej., con alrededor de 200-800 ml de solución de perfusión, a través de la vasculatura de la placenta únicamente. En una forma de realización específica, la placenta se drena de la sangre del cordón y se enjuaga, p. ej., con solución de perfusión, a través de la vasculatura de la placenta para retirar sangre residual antes de dicha perfusión. El perfusato se recolecta y se procesa para retirar

cualquier eritrocito residual. Las células asesinas naturales en las células nucleadas totales en el perfusato pueden aislarse sobre la base de la expresión de CD56 y CD 16. En ciertas formas de realización, el aislamiento de las células PINK comprende el aislamiento mediante la utilización de un anticuerpo para CD56, en donde las células aisladas son CD56⁺. En otra forma de realización, el aislamiento de las células PINK comprende el aislamiento mediante la utilización de un anticuerpo para CD 16, en donde las células aisladas son CD 16⁻. En otra forma de realización, el aislamiento de las células PINK comprende el aislamiento mediante la utilización de un anticuerpo para CD56, y exclusión de una pluralidad de non-Células PINK mediante la utilización de un anticuerpo para CD 16, en donde las células aisladas comprenden células CD56⁺, CD 16⁻.

La separación celular puede lograrse mediante cualquier método conocido en la técnica, p. ej., clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), o, preferentemente, clasificación celular magnética mediante la utilización de microperlas conjugadas con anticuerpos específicos. La separación celular magnética puede realizarse y automatizarse mediante, p. ej., un AUTOMACS™ Separator (Miltenyi).

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para aislar las células asesinas naturales de la placenta, que comprende obtener una pluralidad de células placentarias, y aislar las células asesinas naturales de dicha pluralidad de células placentarias. En una forma de realización específica, las células placentarias son, o comprenden, las células del perfusato placentario, p. ej., células nucleadas totales del perfusato placentario. En otra forma de realización específica, dicha pluralidad de células placentarias son, o comprenden, células placentarias obtenidas mediante digestión mecánica y/o enzimática de tejido placentario. En otra forma de realización, dicho aislamiento se realiza mediante la utilización de uno o más anticuerpos. En una forma de realización más específica, dicho uno o más anticuerpos comprenden uno o más de los anticuerpos para CD3, CD 16 o CD56. En una forma de realización más específica, dicho aislamiento comprende aislar células CD56⁺ de CD56⁻ células en dicha pluralidad de células placentarias. En una forma de realización más específica, dicho aislamiento comprende aislar células placentarias CD56⁺, CD 16⁻, p. ej., células asesinas naturales de la placenta, p. ej., las células PINK, de la células placentarias que son CD56⁺ o CD16⁺. En una forma de realización más específica, dicho aislamiento comprende aislar células placentarias CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻ de las células placentarias que son CD56⁻, CD16⁺, o CD3⁺. En otra forma de realización, dicho método de aislar las células asesinas naturales de la placenta produce una población de células placentarias que es al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o al menos 99% de células asesinas naturales CD56⁺, CD16⁻.

5.4. Células asesinas naturales de la placenta de perfusato y sangre de cordón coincidentes

Se divulgan además en la presente células asesinas naturales obtenidas, y susceptibles de obtenerse de, combinaciones de unidades coincidentes del perfusato placentario y la sangre del cordón umbilical, referidas en este documento como células asesinas naturales combinadas. "Unidades coincidentes," como se utiliza en este documento, indica que las células NK se obtienen de las células del perfusato placentario, y células de sangre periférica de cordón umbilical, en donde las células de sangre periférica de cordón umbilical se obtienen de la sangre del cordón umbilical de la placenta de la cual se obtiene el perfusato placentario, es decir, las células del perfusato placentario y células de sangre periférica de cordón umbilical, y así las células asesinas naturales de cada uno son del mismo individuo.

En ciertas formas de realización, las células asesinas placentarias combinadas comprenden únicamente, o sustancialmente únicamente, células asesinas naturales que son CD56⁺ y CD 16⁻. En ciertas otras formas de realización, las células asesinas placentarias combinadas comprenden las células NK que son CD56⁺ y CD16⁻, y las células NK que son CD56⁺ y CD16⁺. En ciertas formas de realización específicas, las células asesinas placentarias combinadas comprenden al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5% de células asesinas naturales CD56⁺CD16⁻ (Células PINK).

En una forma de realización, las células asesinas naturales combinadas no se han cultivado. En una forma de realización específica, las células asesinas naturales combinadas comprenden un número detectablemente más alto de células asesinas naturales CD3⁻CD56⁺CD16⁻ que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica. En otra forma de realización específica, las células asesinas naturales combinadas comprenden un número detectablemente más bajo de células asesinas naturales CD3⁻CD56⁺CD16⁻ que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica. En otra forma de realización específica, las células asesinas naturales combinadas comprenden un número detectablemente más alto de células asesinas naturales CD3⁻CD56⁺KIR2DL2/L3⁺ que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica. En otra forma de realización específica, las células asesinas naturales combinadas comprenden un número detectablemente más bajo de células asesinas naturales CD3⁻CD56⁺NKp46⁺ que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica. En otra forma de realización específica, las células asesinas naturales combinadas comprenden un número detectablemente más bajo de células asesinas naturales CD3⁻CD56⁺NKp30⁺ que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica. En otra forma de realización específica, las células asesinas naturales combinadas comprenden un número detectablemente más bajo de células asesinas naturales CD3⁻CD56⁺2B4⁺ que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica. En otra forma de realización específica, las células asesinas naturales combinadas comprenden un número detectablemente más

bajo de CD3⁺CD56⁺CD94⁺ células asesinas naturales que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica.

5 En otra forma de realización, las células asesinas naturales combinadas se han cultivado, p. ej., durante 21 días. En una forma de realización específica, las células asesinas naturales combinadas comprenden un número detectablemente más bajo de células asesinas naturales CD3⁺CD56⁺KIR2DL2/L3⁺ que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica. En otra forma de realización específica, las células asesinas naturales combinadas no se han cultivado. En otra forma de realización específica, las células asesinas naturales combinadas comprenden un número detectablemente más alto de CD3⁺CD56⁺NKp44⁺ células asesinas naturales que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica. En una forma de realización específica, las células asesinas naturales combinadas comprenden un número detectablemente más alto de células asesinas naturales CD3⁺CD56⁺NKp30⁺ que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica.

En otra forma de realización, las células asesinas naturales combinadas expresan una cantidad detectablemente más alta de granzima B que un número equivalente de las células asesinas naturales de la sangre periférica.

15 Se divulgan además en la presente combinaciones de la sangre del cordón umbilical y células asesinas naturales combinadas. En varias formas de realización, el cordón umbilical se combina con células asesinas naturales combinadas a alrededor 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 células asesinas naturales combinadas por mililitro de sangre del cordón.

5.5. Combinaciones de perfusato/célula

20 Además del perfusato placentario, las células del perfusato placentario, células asesinas naturales combinadas, y células asesinas naturales de la placenta, p. ej., células asesinas naturales placentarias intermedias, se proporcionan en la presente composiciones que comprenden el perfusato o células, para usar en la supresión de la proliferación de una célula tumoral o una pluralidad de células tumorales.

25 5.5.1. Combinaciones del perfusato placentario, las células de perfusato y las células asesinas naturales intermedias derivadas de la placenta

Se divulgan además en la presente composiciones que comprenden combinaciones del perfusato placentario, las células del perfusato placentario, células asesinas naturales placentarias intermedias, y/o células asesinas naturales combinadas descritas en las Secciones 5.1, 5.3, o 5.4 anteriores. En una forma de realización, por ejemplo, se proporciona en la presente un volumen del perfusato placentario adicionado con una pluralidad de las células del perfusato placentario y/o una pluralidad de células asesinas naturales de la placenta, p. ej., células asesinas naturales placentarias intermedias, por ejemplo, obtenidas de las células del perfusato placentario o tejido placentario alterado mecánicamente o enzimáticamente. En formas de realización específicas, por ejemplo, cada mililitro del perfusato placentario se adiciona con alrededor 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 o más células del perfusato placentario, células asesinas naturales placentarias intermedias, y/o células asesinas naturales combinadas. En otra forma de realización, una pluralidad de las células del perfusato placentario se adiciona con perfusato placentario, células asesinas naturales placentarias intermedias, y/o células asesinas naturales combinadas. En otra forma de realización, una pluralidad de células asesinas naturales placentarias intermedias se adiciona con perfusato placentario, las células del perfusato placentario, y/o células asesinas naturales combinadas. En ciertas formas de realización, cuando el perfusato se usa para adición, el volumen del perfusato es de alrededor de, más del alrededor de, o menos de alrededor de, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% o 1% del volumen total de células (en la solución) más el perfusato. En ciertas otras formas de realización, cuando las células del perfusato placentario se combinan con una pluralidad de las células PINK y/o células asesinas naturales combinadas, las células del perfusato placentario en general comprenden alrededor de, más del alrededor de, o menos que alrededor de, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% o 1% del número total de células. En ciertas otras formas de realización, cuando las células PINK se combinan con una pluralidad de las células del perfusato placentario y/o células asesinas naturales combinadas, las células PINK en general comprenden alrededor de, más del alrededor de, o menos que alrededor de, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% o 1% del número total de células. En ciertas otras formas de realización, cuando células asesinas naturales combinadas se combinan con las células PINK y/o las células del perfusato placentario, las células asesinas naturales combinadas en general comprenden alrededor de, más del alrededor de, o menos que alrededor de, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% o 1% del número total de células. En ciertas otras formas de realización, cuando las células PINK, células asesinas naturales combinadas o las células del perfusato placentario se usan para adicionar el perfusato placentario, el volumen de la solución (p. ej., solución salina, medio de cultivo o lo similar) en la cual se suspenden las células comprende alrededor de, más del alrededor de, o menos de alrededor de, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% o 1% del volumen total del perfusato plus células, donde las células PINK se suspenden hasta alrededor 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 células por mililitro antes de la adición.

En otras formas de realización, cualquiera de las combinaciones anteriores se combina, a su vez, con la sangre del cordón umbilical o células nucleadas de la sangre del cordón umbilical.

Se proporciona además en la presente el perfusato placentario agrupado que se obtiene de dos o más fuentes, p. ej., dos o más placentas, y se combina, p. ej., agrupa. Dicho perfusato agrupado puede comprender aproximadamente volúmenes iguales del perfusato de cada fuente, o puede comprender diferentes volúmenes de cada fuente. Los volúmenes relativos de cada fuente pueden seleccionarse aleatoriamente, o pueden basarse en, p. ej., una concentración o cantidad de uno o más factores celulares, p. ej., citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, o lo similar; la cantidad de células placentarias en el perfusato de cada fuente; u otras características del perfusato de cada fuente. El perfusato de múltiples perfusiones de la misma placenta puede agruparse de manera similar.

De manera similar, se proporcionan en la presente las células del perfusato placentario, y células asesinas naturales intermedias derivadas de la placenta, que se obtienen de dos o más fuentes, p. ej., dos o más placentas, y se agrupan. Dichas células agrupadas pueden comprender aproximadamente números iguales de células de las dos o más fuentes, o diferentes números de células de uno o más de las fuentes agrupadas. Los números relativos de células de cada fuente pueden seleccionarse en base a, p. ej., la cantidad de uno o más tipos de células específicas en las células que se agruparán, p. ej., la cantidad de células CD34⁺, la cantidad de células CD56⁺, etc.

Los pools pueden comprender, p. ej., el perfusato placentario adicionado con células de perfusato placentario; el perfusato placentario adicionado con células asesinas naturales intermedias derivadas de placenta (PINK); el perfusato placentario adicionado con ambas de las células del perfusato placentario y las células PINK; las células del perfusato placentario adicionado con perfusato placentario; las células del perfusato placentario adicionado con las células PINK; las células del perfusato placentario adicionado con ambos el perfusato placentario y las células PINK; las células PINK adicionadas con perfusato placentario; las células PINK adicionadas con células de perfusato placentario; o las células PINK adicionadas con ambas de las células del perfusato placentario y el perfusato placentario.

Se divulgan además en la presente el perfusato placentario, las células del perfusato placentario, y células asesinas naturales placentarias intermedias, y pools de los mismos o combinaciones de los mismos, que se han ensayado para determinar el grado o la cantidad de supresión del tumor (es decir, la potencia) que se esperará de, p. ej., un número dado de perfusato placentario o las células PINK, o un volumen dado del perfusato. Por ejemplo, una alícuota o número muestra de células se contacta con un número conocido de células tumorales en condiciones en las cuales las células tumorales de otro modo proliferarían, y el índice de proliferación de las células tumorales en presencia del perfusato placentario, las células de perfusato, células asesinas naturales de la placenta, o combinaciones de los anteriores, con el paso del tiempo (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 semanas, o más tiempo) se compara con la proliferación de un número equivalente de las células tumorales en ausencia del perfusato, las células de perfusato, células asesinas naturales de la placenta, o combinaciones de los anteriores. La potencia del perfusato placentario, las células del perfusato placentario y/o las células PINK, o combinaciones o pools de los mismos, pueden expresarse, p. ej., como la cantidad de células o el volumen de solución requerido para suprimir el crecimiento de las células tumorales, p. ej., por alrededor de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, o lo similar.

En ciertas formas de realización, el perfusato placentario, las células del perfusato placentario, y las células PINK se proporcionan como unidades administrables de grado farmacéutico. Dichas unidades pueden proporcionarse en volúmenes individuales, p. ej., 100 ml, 150 ml, 200 ml, 250 ml, 300 ml, 350 ml, 400 ml, 450 ml, 500 ml, o lo similar. Dichas unidades pueden proporcionarse para contener un número especificado de, p. ej., células del perfusato placentario, células asesinas naturales placentarias intermedias, o ambas, p. ej., 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 o más células por mililitro, o 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} o más células por unidad. Dichas unidades pueden proporcionarse para contener números especificados de cualquiera de dos, o los tres, del perfusato placentario, las células del perfusato placentario, y/o las células PINK.

En las combinaciones anteriores del perfusato placentario, las células del perfusato placentario y/o las células PINK, cualquiera, cualquiera de dos, o los tres del perfusato placentario, las células del perfusato placentario y/o las células PINK pueden ser análogos a un receptor (es decir, obtenerse del receptor), u homólogos a un receptor (es decir, obtenidos de al menos un individuo distinto que dicho receptor).

Cualquiera de las combinaciones anteriores o pools de las células PINK, las células del perfusato placentario y/o el perfusato placentario puede comprender células asesinas naturales CD56⁺CD16⁺ de, p. ej., el perfusato placentario, sangre periférica, la sangre del cordón umbilical, médula ósea, o lo similar. En formas de realización específicas, las combinaciones comprenden alrededor de, al menos alrededor de, o como máximo alrededor 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 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más células por unidad. Las células asesinas naturales CD56⁺CD16⁺ pueden usarse como aisladas de una fuente natural, o pueden expandirse antes de la inclusión en una de las combinaciones o los pools mencionados con anterioridad. Las células NK CD56⁺CD16⁺ pueden ser autólogas (es decir, obtenidas del mismo individuo que el perfusato placentario, las

células del perfusato placentario y/o las células PINK; u obtenidas de un receptor) u homólogas (es decir, derivadas de un individuo diferente del perfusato placentario, las células del perfusato placentario y/o las células PINK; o de un individuo que no es receptor).

- 5 Preferentemente, cada unidad se etiqueta para especificar el volumen, el número de células, el tipo de células, si la unidad se ha enriquecido para un tipo de célula particular, y/o la potencia de un número dado de las células presentes en la unidad, o un número dado de mililitros de la unidad, produce una supresión mensurable de proliferación de un tipo particular o tipos particulares de célula tumoral.

- 10 Se proporcionan también en la presente composiciones que comprenden células asesinas naturales placentarias intermedias, solas o en combinación con células de perfusato placentario y/o el perfusato placentario. Así, en otro aspecto, se proporciona en la presente una composición que comprende células asesinas naturales aisladas CD56⁺, CD 16⁻, en donde dichas células asesinas naturales se aíslan del perfusato placentario, y en donde dichas células asesinas naturales comprenden al menos 50% de las células presentes en la composición. En una forma de realización específica, dichas células asesinas naturales comprenden al menos 80% de las células presentes en la composición. En otra forma de realización específica, dicha composición comprende células asesinas naturales aisladas CD56⁺, CD16⁺. En una forma de realización más específica, dichas células asesinas naturales CD56⁺, CD16⁺ son de un individuo distinto que dichas células asesinas naturales CD56⁺, CD 16⁻. En otra forma de realización específica, dichas células asesinas naturales aisladas comprenden células asesinas naturales de al menos dos individuos diferentes. En otra forma de realización específica, la composición comprende perfusato placentario aislado. En una forma de realización más específica, dicho perfusato placentario es del mismo individuo que dichas células asesinas naturales. En otra forma de realización más específica, dicho perfusato placentario comprende el perfusato placentario de un individuo distinto que dichas células asesinas naturales. En otra forma de realización específica, la composición comprende las células del perfusato placentario. En una forma de realización más específica, dichas células del perfusato placentario son del mismo individuo que dichas células asesinas naturales. En otra forma de realización más específica, dichas células del perfusato placentario son de un individuo distinto que dichas células asesinas naturales. En otra forma de realización específica, la composición además comprende perfusato placentario aislado y las células del perfusato placentario aisladas, en donde dicho perfusato aislado y dichas células del perfusato placentario aisladas son de individuos diferentes. En otra forma de realización más específica de cualquiera de las realizaciones que anteceden que comprenden el perfusato placentario, dicho perfusato placentario comprende el perfusato placentario de al menos dos individuos. En otra forma de realización más específica de cualquiera de las realizaciones que anteceden que comprenden las células del perfusato placentario, dichas células del perfusato placentario aisladas son de al menos dos individuos.

5.5.2. Composiciones que comprenden células madre placentarias adherentes

- 35 En otras formas de realización, el perfusato placentario, la pluralidad de células del perfusato placentario, y/o una pluralidad de las células PINK, o una combinación o pool de cualquiera de los anteriores, se adiciona con células madre placentarias adherentes. Dichas células madre se describen, p. ej., en Hariri, Patentes de Estados Unidos Nros. 7.045.148 y 7.255.879. Las células madre placentarias adherentes no son trofoblastos.

- 40 El perfusato placentario, la pluralidad de células del perfusato placentario, y/o una pluralidad de las células PINK, o una combinación o pool de cualquiera de los anteriores puede adicionarse con, p. ej., 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 o más células por mililitro, o 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} o más células placentarias adherentes. Las células madre placentarias adherentes en las combinaciones pueden ser, p. ej., células madre placentarias adherentes que se han cultivado durante, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, o 40 duplicaciones de la población, o más.

- 45 Las células madre placentarias adherentes, cuando se cultivan en cultivos primarios o en cultivo celular, se adhieren al sustrato del cultivo de tejidos, p. ej., superficie contenedora del cultivo de tejido (p. ej., plástico de cultivo de tejido). Las células madre placentarias adherentes en cultivo suponen un aspecto en general fibroblastoide, estelado, con a el número de procesos citoplasmáticos que se extienden desde el cuerpo celular central. Las células madre placentarias adherentes son, sin embargo, morfológicamente distinguibles de los fibroblastos cultivados en las mismas condiciones, ya que las células madre placentarias exhiben un número mayor de dichos procesos que los fibroblastos. Morfológicamente, las células madre placentarias también son distinguibles de las células madre hematopoyéticas, que en general suponen una morfología más redondeada, o de adoquín en cultivo.

- 55 Las células madre placentarias adherentes, y poblaciones de las células madre placentarias, útiles en las composiciones y los métodos proporcionados en este documento, expresan una pluralidad de marcadores que pueden usarse para identificar y/o aislar las células madre, o poblaciones de células que comprenden las células madre. Las células madre placentarias adherentes, y las poblaciones de células madre adherentes útiles en las composiciones y los métodos se proporciona en la presente incluyen células madre y poblaciones de células que contienen células madre obtenidas directamente de la placenta, o cualquiera de sus partes (p. ej., amnios, corión, placa amnios-corión, cotiledones placentarios, cordón umbilical, y lo similar). La población de células madre

placentarias adherentes, en una forma de realización, es a la población (es decir, dos o más) de células madre placentarias adherentes en cultivo, p. ej., una población en un recipiente, p. ej., una bolsa.

Las células madre placentarias adherentes en general expresan los marcadores CD73, CD105, CD200, HLA-G, y/u OCT-4, y no expresan CD34, CD38, o CD45. Las células madre placentarias adherentes también pueden expresar HLA-ABC (MHC-I) y HLA-DR. Estos marcadores pueden usarse para identificar células madre placentarias adherentes, y para distinguir las células madre placentarias de otros tipos de células madre. Dado que las células madre placentarias pueden expresar CD73 y CD105, pueden tener características similares a la célula madre mesenquimal. Sin embargo, dado que las células madre placentarias adherentes pueden expresar CD200 y HLA-G, un marcador específico fetal, pueden distinguirse de las células madre mesenquimales, p. ej., las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, que no expresan ni CD200 ni HLA-G. Del mismo modo, la falta de expresión de CD34, CD38 y/o CD45 identifica las células madre placentarias adherentes como células madre no hematopoyéticas.

En una forma de realización, las células madre placentarias adherentes son CD200⁺, HLA-G⁺, en donde las células madre suprimen de manera detectable la proliferación de células con cáncer o el crecimiento tumoral. En una forma de realización específica, dichas células madre adherentes también son CD73⁺ y CD105⁺. En otra forma de realización específica, dichas células madre adherentes también son CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En una forma de realización más específica, dichas células madre adherentes también son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ y CD105⁺. En otra forma de realización, dichas células madre adherentes producen uno o más cuerpos similares a embrioides cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos similares a embrioides.

En otra forma de realización, las células madre placentarias adherentes son CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, en donde dichas células madre suprimen de manera detectable la proliferación de células con cáncer o el crecimiento tumoral. En una forma de realización específica de dichas poblaciones, dichas células madre adherentes son HLA-G⁺. En otra forma de realización específica, dichas células madre adherentes son CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra forma de realización específica, dichas células madre adherentes son CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En una forma de realización más específica, dichas células madre adherentes son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, y HLA-G⁺. En otra forma de realización específica, dichas células madre placentarias adherentes producen uno o más cuerpos similares a embrioides cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos con estructura embrioide.

En otra forma de realización, las células madre placentarias adherentes son CD200⁺, OCT-4⁺, en donde dichas células madre suprimen de manera detectable la proliferación de células con cáncer o el crecimiento tumoral. En una forma de realización específica, dichas células madre adherentes son CD73⁺ y CD105⁺. En otra forma de realización específica, dichas células madre adherentes son HLA-G⁺. En otra forma de realización específica, dichas células madre adherentes son CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En una forma de realización más específica, dichas células madre adherentes son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺. En otra forma de realización específica, las células madre placentarias adherentes producen uno o más cuerpos similares a embrioides cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos similares a embrioides.

En otra forma de realización, las células madre placentarias adherentes son CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺, en donde dichas células madre adherentes suprimen de manera detectable la proliferación de células con cáncer o el crecimiento tumoral. En una forma de realización específica de la pluralidad anterior, dichas células madre adherentes también son CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra forma de realización específica, dichas células madre adherentes también son CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra forma de realización específica, dichas células madre adherentes también son OCT-4⁺. En otra forma de realización específica, dichas células madre adherentes también son CD200⁺. En una forma de realización más específica, dichas células madre adherentes también son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ y CD200⁺.

En otra forma de realización, las células madre placentarias adherentes son CD73⁺, células madre CD105⁺, en donde dichas células madre producen uno o más cuerpos similares a embrioides en condiciones que permiten la formación de cuerpos similares a embrioides, y en donde dichas células madre adherentes suprimen de manera detectable la proliferación de células con cáncer o el crecimiento tumoral. En una forma de realización específica, dichas células madre adherentes también son CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra forma de realización específica, dichas células madre adherentes también son CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra forma de realización específica, dichas células madre adherentes también son OCT-4⁺. En una forma de realización más específica, dichas células madre adherentes también son OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻.

En otra forma de realización, las células madre placentarias adherentes son células madre OCT-4⁺, en donde dichas células madre placentarias adherentes producen uno o más cuerpos similares a embrioides cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos similares a embrioides, y en donde dichas células madre se han identificado como que detectablemente suprimen la proliferación de células con cáncer o el crecimiento tumoral.

En varias formas de realización, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50% al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95% de dichas células placentarias aisladas son OCT4⁺ células madre. En una forma de realización específica de las poblaciones que anteceden, dichas células madre son CD73⁺ y CD105⁺. En otra forma de realización específica, dichas células madre son CD34⁻, CD38⁻, o

CD45⁻. En otra forma de realización específica, dichas células madre son CD200⁺. En una forma de realización más específica, dichas células madre son CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻, y CD45⁻. En otra forma de realización específica, dicha población se ha expandido, por ejemplo, pasado al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, o al menos 20 veces.

- 5 En una forma de realización más específica de cualquiera de las realizaciones que anteceden, las células placentarias adherentes expresan ABC-p (una proteína transportadora de ABC específica de la placenta; véase, p. ej., Allikmets et al, Cancer Res. 58(23):5337-9 (1998)).

- 10 En otra forma de realización, las células madre placentarias adherentes son CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻ y CD 133⁻. En otra forma de realización, las células madre placentarias adherentes, las células madre placentarias constitutivamente secretan IL-6, IL-8 y la proteína quimio atrayente de monocitos (MCP-I).

- 15 Cada una de las células madre placentarias referidas con anterioridad puede comprender células madre placentarias obtenidas y aisladas directamente de la placenta de un mamífero, o las células madre placentarias que se han cultivado y pasado al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30 o más veces, o una combinación de los anteriores. Las pluralidades supresoras de células tumorales de las células madre placentarias adherentes descritas con anterioridad puede comprender alrededor de, al menos, o no más 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} , 1×10^{11} o más células madre placentarias adherentes.

5.5.3. Composiciones que comprenden medios acondicionados de células madre de placenta

- 20 También se proporciona en la presente el uso de una composición supresora de tumor que comprende las células PINK, el perfusato placentario y/o el perfusato placentario, y medio acondicionado adicionalmente. Las células madre placentarias adherentes, las células del perfusato placentario y/o células asesinas naturales placentarias intermedias puede usarse para producir medio acondicionado que es supresor de las células tumorales, es decir, medios que comprenden una o más biomoléculas secretadas o excretadas por las células madre que tienen un efecto supresor detectable de las células tumorales en una pluralidad de uno o más tipos de células inmunes. En varias formas de realización, el medio acondicionado comprende medio en el cual las células placentarias (p. ej., células madre, las células del perfusato placentario, células PINK) han crecido durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más días. En otras formas de realización, el medio acondicionado comprende medio en el cual las células placentarias han crecido hasta al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% de confluencia, o hasta 100% de confluencia. Dicho medio acondicionado puede usarse para soportar el cultivo de una población separada de células placentarias, o células de otra clase. En otra forma de realización, el medio acondicionado se proporciona en la presente comprende medio en el cual las células madre placentarias adherentes y las células madre no placentarias se han cultivado.

- 35 Dicho medio acondicionado puede combinarse con cualquiera de, o una combinación de, el perfusato placentario, las células del perfusato placentario, y/o células asesinas naturales placentarias intermedias para formar una composición supresora de las células tumorales. En ciertas formas de realización, la composición comprende menos de la mitad de medio acondicionado en volumen, p. ej., alrededor de, o menos de alrededor de, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, o 1% en volumen.

- 40 Así, en una forma de realización, se proporciona en la presente una composición que comprende medio de cultivo de un cultivo de las células madre placentarias, en donde dichas células madre placentarias (a) se adhieren a un sustrato; (b) expresan CD200 y HLA-G, o expresan CD73, CD 105, y CD200, o expresan CD200 y OCT-4, o expresan CD73, CD 105, y HLA-G, o expresan CD73 y CD 105 y facilitan la formación de uno o más cuerpos similares a embrioides en a la población de células placentarias que comprenden las células madre placentarias, cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos similares a embrioides, o expresan OCT-4 y facilitan la formación de uno o más cuerpos similares a embrioides en a la población de células placentarias que comprenden las células madre placentarias cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos similares a embrioides; y (c) suprimen de manera detectable el crecimiento o la proliferación de una célula tumoral o la población de células tumorales. En una forma de realización específica, la composición además comprende una pluralidad de dichas células madre placentarias. En otra forma de realización específica, la composición comprende una pluralidad de no-células placentarias. En una forma de realización más específica, dichas células no placentarias comprenden CD34⁺ células, p. ej., células progenitoras hematopoyéticas, tales como la sangre periférica células progenitoras hematopoyéticas, células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón, o la sangre de la placenta células progenitoras hematopoyéticas. Las células no placentarias también puede comprender otras células madre, tales como las células madre mesenquimales, p. ej., células madre mesenquimales derivadas de médula ósea. Las células no placentarias también pueden ser uno o más tipos de células o líneas celulares de adultos. En otra forma de realización específica, la composición comprende un agente anti proliferativo, p. ej., un anticuerpo anti-MIP-1 α o anti-MIP-1 β .

En una forma de realización específica, el medio de cultivo acondicionado con células de placenta o sobrenadante se obtiene de una pluralidad de las células madre placentarias co-cultivadas con una pluralidad de células tumorales a una proporción de alrededor de 1:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, o alrededor de 5:1 las

- células madre placentarias a las células tumorales. Por ejemplo, el medio de cultivo acondicionado o sobrenadante puede obtenerse de un cultivo que comprende alrededor de 1×10^5 las células madre placentarias, alrededor de 1×10^6 las células madre placentarias, alrededor de 1×10^7 las células madre placentarias, o alrededor de 1×10^8 las células madre placentarias, o more. En otra forma de realización específica, el medio de cultivo acondicionado o sobrenadante se obtiene de un co- cultivo que comprende alrededor de 1×10^5 hasta alrededor de 5×10^5 células madre placentarias y alrededor de 1×10^5 células tumorales; alrededor de 1×10^6 hasta alrededor de 5×10^6 las células madre placentarias y alrededor de 1×10^6 células tumorales; alrededor de 1×10^7 hasta alrededor de 5×10^7 células madre placentarias y alrededor de 1×10^7 células tumorales; o alrededor de 1×10 hasta alrededor de 5×10 células madre placentarias y alrededor de 1×10 células tumorales.
- 5
- 10 En una forma de realización específica, el medio acondicionado apropiado para administración a un individuo de 70 kg comprende sobrenadante acondicionado por alrededor de 70 millones de células madre placentarias en alrededor de 200 ml de medio de cultivo.
- El medio acondicionado puede condensarse para preparar un producto administrable de grado farmacéutico. Por ejemplo, el medio acondicionado puede condensarse hasta alrededor de 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% o más por la eliminación de agua, p. ej., por evaporación, liofilización, o lo similar. En una forma de realización específica, por ejemplo, 200 ml de medio acondicionado desde alrededor de 70 millones de células madre placentarias puede condensarse hasta un volumen de alrededor de 180 ml, 160 ml, 140 ml, 120 ml, 100 ml, 80 ml, 60 ml, 40 ml, 20 ml o menos. El medio acondicionado también puede secarse sustancialmente, p. ej., hasta obtener un polvo, p. ej., por evaporación, liofilización o lo similar.
- 15
- 20 5.6. Preservación del perfusato y las células placentarias
- El perfusato placentario o células placentarias, p. ej., las células de perfusato, células asesinas naturales combinadas, y las células PINK, pueden conservarse, es decir, colocarse en condiciones que permitan el almacenamiento prolongado, o en condiciones que inhiban la muerte celular por, p. ej., apoptosis o necrosis.
- El perfusato placentario puede producirse mediante el pasaje de una composición de células placentarias a través de al menos una parte de la placenta, p. ej., a través de la vasculatura de la placenta. La composición de recolección de células placentarias comprende uno o más compuestos que actúan para conservar las células contenidas dentro del perfusato. Dicha composición de recolección de células placentarias se describe en la Sección 5a1, anterior, p. ej., una composición que comprende un inhibidor de apoptosis, inhibidor de necrosis y/o un perfluorocarbono que transporta oxígeno, como se describe en la solicitud de Estados Unidos relacionada Nro. 11/648.812, titulada "Composición mejorada para recolectar y conservar las células madre placentarias y métodos de uso de la composición" presentada el 28 de diciembre de 2006, En una forma de realización, la composición placentaria de la recolección de células, pasada a través de la placenta o tejido placentario, es el perfusato placentario útil en los métodos descritos en la Sección 5.4, a continuación.
- 25
- 30 En una forma de realización, el perfusato placentario y/o células placentarias se recolectan de la placenta post-parto de un mamífero, p. ej., un humano, mediante contactar las células con una composición de recolección de células placentarias que comprenden un inhibidor de apoptosis y un perfluorocarbono que transporta oxígeno, en donde dicho inhibidor de apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para reducir o prevenir apoptosis la en la población de células madre, cuando se compara con una población de células madre que no se contactan con el inhibidor de apoptosis. Por ejemplo, la placenta puede perfundirse con la composición placentaria de la recolección de células, y células placentarias, p. ej., células placentarias nucleadas totales, se aíslan a partir de esto. En una forma de realización específica, el inhibidor de apoptosis es un inhibidor de caspasa. En otra forma de realización específica, dicho inhibidor de apoptosis es un inhibidor de JNK. En una forma de realización más específica, dicho inhibidor de JNK no modulan la diferenciación o la proliferación de dichas células madre. En otra forma de realización, la composición de recolección de células placentarias comprende dicho inhibidor de apoptosis y dicho perfluorocarbono que transporta oxígeno en fases separadas. En otra forma de realización, la composición de recolección de células placentarias comprende dicho inhibidor de apoptosis y dicho perfluorocarbono que transporta oxígeno en una emulsión. En otra forma de realización, la composición de recolección de células placentarias comprende adicionalmente un emulsionante, p. ej., lecitina. En otra forma de realización, dicho inhibidor de apoptosis y dicho perfluorocarbono son entre alrededor de 0°C y alrededor de 25°C en el momento de contactar las células placentarias. En otra forma de realización más específica, dicho inhibidor de apoptosis y dicho perfluorocarbono son entre alrededor de 2°C y 10°C , o entre alrededor de 2°C y alrededor de 5°C , en el momento de contactar las células placentarias. En otra forma de realización más específica, dicho acto de contactar se realiza durante el transporte de dicha población de células madre. En otra forma de realización más específica, dicho acto de contactar se realiza durante el congelamiento y descongelamiento de dicha población de células madre.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55 En otra forma de realización, el perfusato placentario y/o las células placentarias pueden recolectarse y conservarse mediante contactar el perfusato y/o células con un inhibidor de apoptosis y un compuesto conservador de órganos, en donde dicho inhibidor de apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para reducir o prevenir apoptosis de las células, cuando se compara con perfusato o células placentarias que no se contactan con el inhibidor de apoptosis.

5 En una forma de realización específica, el compuesto conservador de órganos es solución UW (descrita en la Patente de Estados Unidos Nro. 4.798.824; también se conoce como VIASPAN™; véase además Southard et al, Transplantation 49(2):251-257 (1990) o una solución descrita en Stern et al, la Patente de Estados Unidos Nro. 5.552.267. En otra forma de realización, dicha composición conservadora de órganos es almidón de hidroxietilo, ácido lactobiónico, rafinosa, o una combinación de los anteriores. En otra forma de realización, la composición de recolección de células placentarias comprende adicionalmente un perfluorocarbono que transporta oxígeno, ya sea en dos fases o como emulsión.

10 En otra forma de realización del método, el perfusato placentario y/o células placentarias se contactan con una composición de recolección de células placentarias que comprende un inhibidor de apoptosis y perfluorocarbono que transporta oxígeno, compuesto conservador de órganos, o una combinación de los anteriores, durante la perfusión. En otra forma de realización, las células placentarias se contactan con dicho compuesto de recolección de células madre después de la recolección mediante la perfusión.

15 Normalmente, durante la recolección, el enriquecimiento y el aislamiento de las células placentarias, es preferible minimizar o eliminar la tensión celular debido a hipoxia y fuerza mecánica. En otra forma de realización del método, por lo tanto, el perfusato placentario, una célula placentaria, o la población de células placentarias, se expone a una condición hipóxica durante la recolección, el enriquecimiento y el aislamiento durante menos de seis horas durante dicha preservación, en donde una condición hipóxica es una concentración de oxígeno que es menor que la concentración normal de oxígeno en la sangre. En una forma de realización más específica, dicha población de células placentarias se expone a dicha condición hipóxica durante menos de dos horas durante dicha preservación.

20 En otra forma de realización más específica, dicha población de células placentarias se expone a dicha condición hipóxica durante menos de una hora, o menos de treinta minutos, o no se expone a una condición hipóxica, durante la recolección, el enriquecimiento y el aislamiento. En otra forma de realización específica, dicha población de células placentarias no se expone una tensión de cizallamiento durante la recolección, el enriquecimiento y el aislamiento.

25 Las células placentarias se proporciona en la presente pueden criopreservarse, p. ej., en medio de criopreservación en pequeños recipientes, p. ej., ampollas. El medio de criopreservación apropiado incluye, pero no se limita a, medio de cultivo incluyendo, p. ej., medio de crecimiento, o medio de congelamiento de células, por ejemplo medio de congelamiento de células disponible en el mercado, p. ej., C2695, C2639 o C6039 (Sigma). El medio de criopreservación preferentemente comprende DMSO (dimetilsulfóxido), a una concentración de, p. ej., alrededor de 10% (v/v). El medio de criopreservación puede comprender agentes adicionales, por ejemplo, metilcelulosa y/o glicerol. Las células placentarias se enfrían preferentemente a alrededor de 1°C/min durante la criopreservación. Una temperatura preferida de criopreservación es de alrededor de -80°C hasta alrededor de -180°C, preferentemente alrededor de -125°C hasta alrededor de -140°C. Las células placentarias criopreservadas pueden transferirse a nitrógeno líquido antes de descongelar para su uso. En algunas formas de realización, por ejemplo,

30 una vez que las ampollas han alcanzado alrededor de -90°C, se transfieren a un área de almacenamiento de nitrógeno líquido. Las células criopreservadas preferentemente se descongelan a una temperatura de alrededor de 25°C hasta alrededor de 40°C, preferentemente hasta una temperatura de alrededor de 37°C.

5.7. Uso del perfusato placentario, las células PINK, y células asesinas naturales de la placenta combinados para suprimir el crecimiento de las células tumorales

40 Se proporcionan también en la presente métodos para suprimir el crecimiento, p. ej., proliferación, de células tumorales mediante la utilización del perfusato placentario, células aisladas del perfusato placentario, células asesinas naturales combinadas aisladas, o células asesinas naturales de la placenta aisladas, p. ej., células asesinas naturales intermedias derivadas de la placenta.

45 En una forma de realización, se proporciona en la presente un método de supresión de la proliferación de una célula tumoral, o una pluralidad de células tumorales, que comprende contactar la célula tumoral o una pluralidad de células tumorales con perfusato placentario, las células del perfusato placentario, células asesinas naturales combinadas aisladas, y/o las células PINK, de manera tal que la proliferación de la célula tumoral o una pluralidad de células tumorales se reduce detectablemente comparado con una célula tumoral o una pluralidad de células tumorales de los mismos tipos que no se contactan con el perfusato placentario, las células de perfusato, células asesinas naturales combinadas aisladas, y/o las células PINK.

50

Como se utiliza en este documento, "contactar," en una forma de realización, abarca el contacto físico directo, p. ej., célula-célula, entre el perfusato placentario, las células del perfusato placentario, las células asesinas naturales de la placenta, p. ej., células asesinas naturales placentarias intermedias, y/o células asesinas naturales combinadas aisladas; y una célula tumoral o una pluralidad de células tumorales. En otra forma de realización, "contactar" abarca la presencia en el mismo espacio físico, p. ej., el perfusato placentario, las células del perfusato placentario, células asesinas naturales de la placenta, p. ej., células asesinas naturales placentarias intermedias, y/o células asesinas naturales combinadas aisladas se colocan en el mismo recipiente p. ej., plato de cultivo, placa de múltiples pocillos) que una célula tumoral o una pluralidad de células tumorales. En otra forma de realización, se logra "contactar" el perfusato placentario, las células del perfusato placentario, células asesinas naturales combinadas o células asesinas naturales placentarias intermedias, y una célula tumoral o una pluralidad de células tumorales, p. ej.,

60

mediante inyectar o infundir el perfusato placentario o las células, p. ej., las células del perfusato placentario, células asesinas naturales combinadas o células asesinas naturales placentarias intermedias en un individuo, p. ej., un ser humano que comprende una célula tumoral o una pluralidad de células tumorales, p. ej., un paciente con cáncer.

5 En ciertas formas de realización, el perfusato placentario se usa en cualquier cantidad que produzca un beneficio terapéutico detectable a un individuo que comprende una célula tumoral o una pluralidad de células tumorales, p. ej., un paciente con cáncer. En ciertas otras formas de realización, las células del perfusato placentario, células asesinas naturales placentarias intermedias, y/o células asesinas naturales combinadas se usan en cualquier cantidad que produzca un beneficio terapéutico detectable a un individuo que comprende una célula tumoral o una pluralidad de células tumorales. Así, en otra forma de realización, se proporciona en la presente un método de supresión de la proliferación de una célula tumoral, o una pluralidad de células tumorales, que comprende contactar la célula tumoral o una pluralidad de células tumorales con perfusato placentario, las células del perfusato placentario y/o una célula asesina natural intermedia derivada de la placenta, o una pluralidad de las células PINK, dentro de un individuo de manera tal que dicho acto de contactar es detectablemente y demostrablemente beneficioso desde el punto de vista terapéutico para dicho individuo.

15 Como se utiliza en este documento, los "beneficios terapéuticos" incluyen, aunque no se limitan a, p. ej., reducción en el tamaño de a tumor; disminución o interrupción de la expansión de un tumor; reducción en la cantidad de células con cáncer en una muestra de tejido, p. ej., una muestra de sangre, por volumen unitario; la mejora clínica en cualquier síntoma de del cáncer en particular que tenga dicho individuo, la disminución o interrupción del empeoramiento de cualquier síntoma de del cáncer particular que tenga el individuo, etc. Contactar del perfusato placentario, las células del perfusato placentario y/o las células PINK que logra cualquiera de uno o más de dichos beneficios terapéuticos se dice que es beneficioso desde el punto de vista terapéutico.

25 En ciertas formas de realización, las células del perfusato placentario, p. ej., células nucleadas del perfusato placentario, células asesinas naturales combinadas, y/o células asesinas naturales placentarias intermedias se usan en cualquier cantidad o número que produzca un beneficio terapéutico detectable a un individuo que comprende una célula tumoral o una pluralidad de células tumorales, p. ej., un paciente con cáncer. Las células del perfusato placentario, células asesinas naturales combinadas y/o células asesinas naturales de la placenta, p. ej., células asesinas naturales placentarias intermedias pueden administrarse a dicho individuo mediante números de células, p. ej., dicho individuo puede recibir la administración a alrededor de, al menos alrededor de, o como máximo alrededor 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} , o 5×10^{10} las células del perfusato placentario, células asesinas naturales combinadas y/o células asesinas naturales. En otras formas de realización, las células del perfusato placentario, células asesinas naturales combinadas, y/o células asesinas naturales intermedias derivadas de la placenta pueden administrarse a dicho individuo mediante números de células, p. ej., dicho individuo puede recibir la administración a alrededor de, al menos alrededor de, o como máximo alrededor 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} , o 5×10^{10} las células del perfusato placentario, células asesinas naturales combinadas, y/o células asesinas naturales por kilogramo del individuo. Las células del perfusato placentario y/o las células asesinas naturales intermedias derivadas de la placenta pueden administrarse a dicho individuo de acuerdo con una proporción apropiada entre las células del perfusato placentario y/o células asesinas naturales de la placenta, p. ej., células asesinas naturales placentarias intermedias, y las células tumorales en dicho individuo. Por ejemplo, las células del perfusato placentario y/o células asesinas naturales de la placenta, p. ej., células asesinas naturales placentarias intermedias, pueden administrarse a dicho individuo en una proporción de alrededor de, al menos alrededor de o como máximo alrededor 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 o 100:1 a la cantidad de células tumorales en el individuo. La cantidad de células tumorales en dicho individuo puede estimarse, p. ej., mediante el recuento de la cantidad de células tumorales en una muestra de tejido del individuo, p. ej., muestra de sangre, biopsia, o lo similar. En formas de realización específicas, p. ej., para tumores sólidos, dicho recuento se realiza en combinación con la toma de imágenes del tumor o de los tumores para obtener un volumen de tumor aproximado.

50 Se divulgan además en la presente es un método para la supresión de la proliferación de una célula tumoral o una pluralidad de células tumorales mediante la utilización de combinaciones del perfusato placentario, las células del perfusato placentario, células asesinas naturales combinadas, y/o células asesinas naturales intermedias derivadas de la placenta. En varias formas de realización, se proporciona en la presente un método de supresión de la proliferación de una célula tumoral o una pluralidad de células tumorales que comprende contactar dicha célula tumoral o las células tumorales con perfusato placentario adicionado con una pluralidad de las células del perfusato placentario o las células PINK; las células del perfusato placentario adicionado con perfusato placentario o una pluralidad de las células PINK; las células PINK adicionadas con perfusato placentario y las células del perfusato placentario una pluralidad de las células PINK y una pluralidad de células asesinas naturales combinadas; una pluralidad de células asesinas naturales combinadas y una pluralidad de las células del perfusato placentario; el perfusato placentario adicionado con células asesinas naturales combinadas; o una combinación de la totalidad del perfusato placentario, las células del perfusato placentario, células asesinas naturales combinadas, y las células PINK.

En una forma de realización específica, por ejemplo, la proliferación de una célula tumoral o una pluralidad de células tumorales se suprimen mediante el perfusato placentario adicionado con una pluralidad de las células del perfusato placentario, células asesinas naturales combinadas y/o una pluralidad de células asesinas naturales placentarias intermedias. En formas de realización específicas, por ejemplo, cada mililitro del perfusato placentario se adiciona con alrededor de 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 o más células del perfusato placentario o células asesinas naturales placentarias intermedias. En otras realizaciones específicas, el perfusato placentario, p. ej., una unidad (es decir, la recolección de una placenta individual), o alrededor de 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 ml del perfusato, se adiciona con alrededor 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 o más células PINK, células asesinas naturales combinadas, y/o las células del perfusato placentario por mililitro, o 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} o más células PINK, células asesinas naturales combinadas, y/o las células del perfusato placentario.

En otra forma de realización específica, la proliferación de una célula tumoral o una pluralidad de células tumorales se suprimen mediante una pluralidad de las células del perfusato placentario adicionado con perfusato placentario, células asesinas naturales combinadas, y/o células asesinas naturales placentarias intermedias. En formas de realización más específicas, alrededor 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 o más células del perfusato placentario por mililitro, o 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} o más células del perfusato placentario, se adicionan con alrededor de, o al menos alrededor 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 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más células PINK. En otras formas de realización más específicas, alrededor 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 o más células del perfusato placentario, las células PINK, y/o células asesinas naturales combinadas por mililitro, o 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} o más células del perfusato placentario, se adicionan con alrededor de, o al menos alrededor 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 o 1000 ml del perfusato, o alrededor de 1 unidad del perfusato.

En otra forma de realización específica, la proliferación de una célula tumoral o una pluralidad de células tumorales se suprimen mediante una pluralidad de células asesinas naturales placentarias intermedias adicionadas por el perfusato placentario, las células del perfusato placentario, y/o células asesinas naturales combinadas. En formas de realización más específicas, alrededor 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 o más células asesinas naturales placentarias intermedias, o 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} o más células PINK, se adicionan con alrededor 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 o más células del perfusato placentario y/o células asesinas naturales combinadas por mililitro, o 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} o más células del perfusato placentario y/o células asesinas naturales combinadas. En otras formas de realización más específicas, alrededor 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 o más células del perfusato placentario y/o células asesinas naturales combinadas por mililitro, o 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} o más células asesinas naturales placentarias intermedias y/o células asesinas naturales combinadas se adicionan con alrededor de, o al menos alrededor 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 o 1000 ml del perfusato, o alrededor de 1 unidad del perfusato.

En otra forma de realización, la proliferación de una célula tumoral o una pluralidad de células tumorales se suprime mediante contactar la célula tumoral o las células tumorales con perfusato placentario, las células de perfusato, las células PINK, y/o células asesinas naturales combinadas adicionadas con células madre placentarias adherentes. En formas de realización específicas, el perfusato placentario, las células de perfusato, o las células PINK se adicionan con alrededor 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 o más células madre placentarias adherentes por mililitro, o 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} o más células madre placentarias adherentes.

En otra forma de realización, la proliferación de una célula tumoral o una pluralidad de células tumorales se suprime mediante contactar la célula tumoral o las células tumorales con perfusato placentario, las células de perfusato, células asesinas naturales combinadas, y/o las células PINK adicionadas con medio acondicionado con células madre de placenta adherentes, p. ej., 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 medio de cultivo acondicionado con células madre por unidad del perfusato, las células de perfusato, células asesinas naturales combinadas, y/o las células PINK, o per 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} células.

En otras formas de realización, el perfusato placentario, las células del perfusato placentario, células asesinas naturales de la placenta, p. ej., las células PINK, células asesinas naturales combinadas, y combinaciones y pools que comprende las mismas, se usan como se obtuvieron inicialmente es decir, perfusato como se obtiene durante la

perfusión, las células del perfusato placentario as aisladas de dicho perfusato, células asesinas naturales combinadas de dicho perfusato y la sangre del cordón umbilical coincidente, o las células PINK aisladas de dicho perfusato o dichas células del perfusato placentario. En otras formas de realización, el perfusato placentario, las células del perfusato placentario, las células PINK, y combinaciones y pools de los mismos se procesan antes de usar. Por ejemplo, el perfusato placentario puede usarse en su forma original, no procesada como se recolecta de la placenta. El perfusato placentario también puede procesarse antes de usar, p. ej., mediante la selección negativa de uno o más tipos de células, reducción en volumen por deshidratación; liofilización y rehidratación, etc. De manera similar, poblaciones de las células de perfusato puede usarse como se aíslan inicialmente del perfusato placentario, p. ej., as células nucleadas totales del perfusato placentario, o pueden procesarse, p. ej., para retirar uno o más tipos de células (p. ej., eritrocitos). Las células PINK puede usarse como se aíslan inicialmente del perfusato placentario, p. ej., mediante la utilización de microperlas de CD56, o pueden procesarse, p. ej., para retirar uno o más tipos de células no asesinas.

En otra forma de realización, se proporciona en la presente un método de supresión de la proliferación de una célula tumoral o las células tumorales, que comprende contactar la célula tumoral o las células tumorales con perfusato placentario, las células del perfusato placentario, las células PINK, células asesinas naturales combinadas, o pools o combinaciones que comprenden las mismas, en donde dicho perfusato placentario, las células del perfusato placentario, las células PINK, células asesinas naturales combinadas, o pools o combinaciones que comprenden las mismas se han contactado con interleucina-2 (IL-2) durante un período de tiempo antes de dicho acto de contactar. En ciertas formas de realización, dicho período de tiempo es de alrededor de, al menos, o como 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 o 48 antes de dicho acto de contactar.

El perfusato, las células de perfusato, las células PINK, células asesinas naturales combinadas, o pools y/o combinaciones de los mismos pueden administrarse una vez a un individuo que tiene cáncer, o un individuo que tiene las células tumorales durante el transcurso de una terapia contra el cáncer, o puede administrarse varias veces, p. ej., una vez cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 horas, o una vez cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, o una vez cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más semanas durante la terapia. El perfusato, las células de perfusato, las células PINK, pools y/o combinaciones de los mismos pueden administrarse sin importar si el perfusato, las células de perfusato, las células PINK, pools y/o combinaciones de los mismos se han administrado a una persona que tiene cáncer, o que tuvo células tumorales, en el pasado. Así, los métodos que se proporcionan en la presente abarcan la administración a una persona que tiene cáncer o que tiene células tumorales cualquier combinación del perfusato placentario, las células de perfusato, las células PINK, pools y/o combinaciones que comprenden las mismas.

En una forma de realización específica, las células tumorales son células sanguíneas con cáncer. En varias formas de realización específicas, las células tumorales son células de carcinoma ductal primario, células de leucemia, células de leucemia de células T aguda, células de linfomamieloide crónico (CML), células de leucemia mielógena aguda, células de leucemia mielógena crónica (CML), células de carcinoma de pulmón, células de carcinoma de colon, células de linfoma histiocítico, una célula de mieloma múltiple, células de retinoblastoma, células de carcinoma colo-rectal o células de adenocarcinoma colo-rectal.

El perfusato placentario, las células de perfusato, las células PINK, células asesinas naturales combinadas, pools, y/o combinaciones que comprenden las mismas pueden ser parte de un régimen de terapia contra el cáncer que incluye uno o más agentes distintos contra el cáncer. Dichos agentes contra el cáncer se conocen bien en el arte. Los agentes contra el cáncer específicos que pueden administrarse a un individuo que tiene cáncer, además del perfusato, las células de perfusato, las células PINK, pools y/o combinaciones de los mismos, incluyen, aunque no se limitan a: acivicina; aclarubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; amsacrina; anastrozol; antramcina; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfan; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; celecoxib (inhibidor de COX-2); clorambucil; cirolemicina; cisplatino; cladribina; crisnatol mesilato; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziquona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionate de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflomitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato de estramustina sódico; etanidazol; etoposida; fosfato de etoposida; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hydroxyurea; clorhidrato de idarubicina; ifosfamida; ilmofosina; iproplatio; irinotecan; clorhidrato de irinotecan; lanreotida acetato; letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometrexol de sodio; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; megestrol acetato; melengestrol acetato; melfalan; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato de sodio; metoprina; meturedpa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogillina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatino; oxisuran; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; peplomicina sulfato; perfosfamida; pipobroman; piposulfan; piroxantrone clorhidrato de;

- plicamicina; plomestano; porfímero de sodio; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puomicina; clorhidrato de puomicina; pirazofurina; riboprina; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; sparfosato de sodio; sparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan de sodio; taxotere; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfin; teniposida; 5 teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifena; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; trimetrexato glucuronato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; vinepidine sulfato; sulfato de vinglicinato; sulfato vinleurosina; tartrato vinorelbina; sulfato vinrosidina; sulfato vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; y clorhidrato de zorubicina.
- 10 Otros fármacos contra el cáncer incluyen, aunque no se limitan a: 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografolida; inhibidores de angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína-1 morfogénica anti-dorsalizante; antiandrógenos, carcinoma de próstata; antiestrógenos; antineoplaston; oligonucleótidos antisentido; 15 glicinato de afidicolina; moduladores génicos de apoptosis; reguladores de apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina deaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetron; azatoxina; azatirosina; derivados de baccatin III; balanol; batimastat; antagonistas BCR/ ABL; benzoclorinas; benzoilstaurosporina; derivados de beta lactama; beta-aletina; betaclamina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilispermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; 20 bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílagos; carzelesina; inhibidores de quinasa de la casina (ICOS); castanoespermina; cecropina B; cetorelix; clorlns; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; 25 criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cypemicina; citarabine ocfosfato; citolytic factor; citostatina; dacliximab; decitabina; dehydroidenmin B; desloreline; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamilo; diaziquna; didemnin B; didox; dietilnorspermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; difenil spiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetron; doxiluridina; doxorubicina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; 30 emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógenos; antagonistas de estrógenos; etanidazol; fosfato de etoposida; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; gadolinium texafirina; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatona; hepsulfam; heregulina; bisacetamida de hexametileno; hipericina; ácido ibandronico; 35 idarubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imatinib (p. ej., GLEEVEC®), imiquimod; péptidos inmuno estimulantes; inhibidor del receptor del factor-1 de crecimiento símil insulina; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; iododoxorubicina; ipomeanol, 4-; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetron; jasplakinolide; kahalalide F; triacetato de lamellarin-N; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinan; leptostatina; letrozol; factor inhibidor de la leucemia; interferón alfa de leucocitos; leuprolida + estrógenos + 40 progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipofílico; compuestos lipofílicos de platino; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; loxoribina; lurtotecan; lutetio texafirina; lisofilina; péptidos lífticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspina; inhibidores de matrilysin; inhibidores de metaloproteinasas de matriz; menogarilo; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; mitoguazona; mitolactol; 45 análogos de mitomicina; mitonafida; factor del crecimiento de fibroblastos de mitoxina- saporina; mitoxantrona; mofarotena; molgramostim; Erbitux, gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A+ pared celular de miobacteria sk; mopidamol; agente contra el cáncer a base de mostaza; micaperóxido B; extracto de la pared celular micobacterial; miriaporona; N-acetildinalina; benzaminas N- sustituidas; nafareline; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavina; naffefina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridronico; nilutamida; nisamicina; moduladores de ácido nítrico; antioxidante de nitrógeno; nitrulina; oblimersen (GENASENSE®); O⁶-bencilguanina; octreótido; 50 okicenone; oligonucleótidos; onapristona; ondansetron; ondansetron; oracina; inductor oral de citoquina; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxanomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrhizoxina; ácido pamidronico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato de pentosán sódico; pentostatina; pentrozol; perflubron; perfosfamida; alcohol perillíco; fenazinomicina; 55 fenilacetato; inhibidores de fosfatasa; picibanilo; clorhidrato de pilocarpina; pirarubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor activador de plasminógenos; complejo de platino; compuestos de platino; complejo platino-triamina; porfímero de sodio; porfiromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores de proteasoma; modulador inmunológico basado en proteína A; inhibidor de la quinasa C de las proteínas; inhibidores de la quinasa C de las proteínas, microalgal; inhibidores de la fosfatasa de tirosina de las proteínas; inhibidores de fosforilasa de nucleósidos de purina; purpurinas; pirazoloacridina; congulado de polioxi-etileno hemoglobina piridoxilada; antagonistas raf; raltitrexed; ramosetron; inhibidores de transferasa de la proteína ras farnesilo; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; reteliptina demetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; RII 60 retinamida; rohitukina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopina; SarCNU; sarcofitol A; sargramostim; imitadores de Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de senescence; oligonucleótidos sentido;

inhibidor de la transducción de la señal; sizofiran; sobuzoxana; borocaptato de sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína que se une a somatomedina; sonermina; ácido esparósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiostatina 1; esqualamina; estipiámina; inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonistas de péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; talimustina; metiyoduro de tamoxifeno; 5 tauromustina; tazaroteno; tecogalan de sodio; tegafur; telurapirilio; inhibidores de telomerasa; temporfina; teniposida; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; imitador de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinan; hormona estimulante de tiroides; etiopurpurina de etil estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; inhibidores de traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turoesterida; inhibidores de quinasa de la tirosina; 10 tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor de crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de uroquinasa; vaporeótido; variolina B; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y estimálmero de zinostatina.

5.8. Tratamiento de las células asesinas naturales con compuestos inmunomoduladores

Las células asesinas naturales aisladas, p. ej., las células PINK o células asesinas naturales combinadas, como se describe en este documento en otra parte, pueden tratarse con un compuesto modulador inmunológico, p. ej., 15 contactado con un compuesto modulador inmunológico, para potenciar la actividad antitumoral de la célula. Así, se proporciona en la presente un método para aumentar la citotoxicidad de una célula asesina natural a una célula tumoral que comprende contactar la célula asesina natural con un compuesto modulador inmunológico durante un tiempo y en una concentración suficiente para la célula asesina natural para demostrar la mayor citotoxicidad hacia una célula tumoral comparado con una célula asesina natural que no se contactan con el compuesto 20 inmunomodulador. En otra forma de realización, se proporciona en la presente un método para aumentar la expresión de granzima B en una célula asesina natural que comprende contactar la célula asesina natural con un compuesto modulador inmunológico durante un tiempo y en una concentración suficiente para la célula asesina natural para demostrar el aumento de la expresión de granzima B comparado con una célula asesina natural que no se contactan con el compuesto inmunomodulador. El compuesto inmunomodulador puede ser cualquier compuesto descrito a continuación, p. ej., lenalidomida o pomalidomida.

También se proporciona en la presente un método para aumentar la citotoxicidad de una población de células asesinas naturales, p. ej., las células PINK o células asesinas naturales combinadas, a una pluralidad de células tumorales que comprende contactar la población de células asesinas naturales con un compuesto modulador 30 inmunológico durante un tiempo y en una concentración suficiente para la población de células asesinas naturales para demostrar una citotoxicidad detectablemente mayor hacia dicha pluralidad de células tumorales comparado con un número equivalente de células asesinas naturales que no se contactan con el compuesto inmunomodulador. En otra forma de realización, se proporciona en la presente un método para aumentar la expresión de granzima B en la población de células asesinas naturales que comprende contactar la población de células asesinas naturales con un compuesto modulador inmunológico durante un tiempo y en una concentración suficiente para la población de 35 células asesinas naturales para expresar una cantidad detectablemente mayor de granzima B comparado con un número equivalente de células asesinas naturales que no se contactan con el compuesto inmunomodulador. En una forma de realización específica, dicha población de células asesinas naturales se contiene dentro de las células del perfusato placentario, p. ej., células nucleadas totales del perfusato placentario.

40 En formas de realización específicas de las formas de realización anteriores, las células asesinas naturales son células asesinas naturales placentarias intermedias CD56⁺, CD 16⁻ (Células PINK). En otra forma de realización específica de las formas de realización anteriores, las células asesinas naturales son células asesinas naturales combinadas, es decir, células asesinas naturales del perfusato placentario y la sangre del cordón umbilical coincidentes.

45 En otra forma de realización específica, dicha pluralidad de células asesinas naturales, p. ej., las células PINK o células asesinas naturales combinadas, se contactan con dicho compuesto modulador inmunológico expresan uno o más de BAX, CCL5, CCR5, CSF2, FAS, GUSB, IL2RA, o TNFRSF1 8 a un nivel más alto que un número equivalente de dichas células asesinas naturales que no se contactan con dicho compuesto modulador inmunológico. En otra forma de realización específica, dicha pluralidad de células asesinas naturales, p. ej., las células PINK, en contacto 50 con dicho compuesto modulador inmunológico expresan uno o más de ACTB, BAX, CCL2, CCL3, CCL5, CCR5, CSF1, CSF2, ECE1, FAS, GNLY, GUSB, GZMB, IL1A, IL2RA, IL8, IL10, LTA, PRF1, PTGS2, SKI, y TBX21 a un nivel más alto que un número equivalente de dichas células asesinas naturales que no se contactan con dicho compuesto modulador inmunológico.

También se proporciona en la presente un método para aumentar la citotoxicidad de una población de células de perfusato placentario humano, p. ej., células nucleadas totales del perfusato placentario, hacia una pluralidad de células tumorales, que comprende contactar las células del perfusato placentario con un compuesto modulador 55 inmunológico durante un tiempo y en una concentración suficiente para las células del perfusato placentario para demostrar una citotoxicidad detectablemente mayor hacia dicha pluralidad de células tumorales comparado con un número equivalente de las células del perfusato placentario que no se contactan con el compuesto inmunomodulador. En otra forma de realización, se proporciona en la presente un método para aumentar la 60

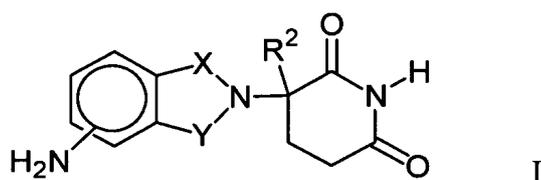
expresión de granzima B en a la población de las células del perfusato placentario que comprende contactar la población de las células del perfusato placentario con un compuesto modulador inmunológico durante un tiempo y en una concentración suficiente para la población de las células de perfusato placentario para expresar una cantidad detectablemente mayor de granzima B comparado con un número equivalente de las células del perfusato placentario que no se contactan con el compuesto inmunomodulador.

Los compuestos inmunomoduladores pueden o bien adquirirse en el comercio o prepararse de acuerdo con los métodos descritos en las patentes o las publicaciones de patentes a las que se hace referencia en este documento. Además, las composiciones ópticamente puras pueden sintetizarse en forma asimétrica o resolverse mediante la utilización de agentes de resolución conocidos o columnas quirales además de otras técnicas estándar de química orgánica sintética. Los compuestos inmunomoduladores pueden ser racémicos, estereoquímicamente enriquecidos o estereoméricamente puros, y pueden abarcar las sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico, solvatos, y sus profármacos.

Como se utiliza en este documento y a menos que se indique de otro modo, los términos "compuestos inmunomoduladores" abarcan pequeñas moléculas orgánicas que inhiben marcadamente TNF- α , IL-1 β y IL-12 de monocitos inducido por LPS, e inhiben parcialmente la producción de IL-6. En ejemplos específicos, el compuesto inmunomoduladores son lenalidomida, pomalidomida o talidomida.

Ejemplos específicos de los compuestos inmunomoduladores, incluyen, aunque no se limitan a, derivados ciano y carboxi de estirenos sustituidos tales como aquellos divulgados en la Patente de Estados Unidos Nro. 5.929.117; -oxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidin-3-il) isoindolinas y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidine-3-il) isoindolinas tales como aquellas descritas en las Patentes de Estados Unidos Nros. 5.874.448 y 5.955.476; las 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-oxoisoindolinas tetra sustituidas que se describen en la Patente de Estados Unidos Nro. 5.798.368; 1-oxo y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il) isoindolinas (p. ej., derivados 4-metilo de talidomida), incluyendo, pero sin limitarse a, aquellos divulgados en las Patentes de Estados Unidos Nros. 5.635.517, 6.476.052, 6.555.554, y 6.403.613; 1-oxo y 1,3-dioxoisoindolinas sustituidas en la posición 4 o 5 del anillo de indolina (p. ej., ácido 4-(4-amino-1,3-dioxoisoindolina-2-il)-4-carbamoilbutanoico) que se describen en la Patente de Estados Unidos Nro. 6.380.239; isoindolina-1-ona y isoindolina-1,3-diona sustituida en la posición 2 con 2,6-dioxo-3-hidroxipiperidin-5-ilo (p. ej., 2-(2,6-dioxo-3-hidroxi-5-fluoropiperidin-5-il)-4-aminoisoindolin-1-ona) que se describen en la Patente de Estados Unidos Nro. 6.458.810; una clase de amigas cíclicas no polipeptídicas que se divulgan en las Patentes de Estados Unidos Nros. 5.698.579 y 5.877.200; aminotalidomida, además de análogos, productos de hidrólisis, metabolitos, derivados y precursores de aminotalidomida, y 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il) ftalimidas sustituidas y 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisoindoles sustituidos tales como aquellos descritos en las Patentes de Estados Unidos Nros. 6.281.230 y 6.316.471; y compuestos isoindol-imida tales como aquellas descritas en la publicación de patente de Estados Unidos Nro. 2003/0045552 A1, la Patente de Estados Unidos Nro. 7.091.353, y WO 02/059106. Los compuestos inmunomoduladores no incluyen talidomida.

En ciertas formas de realización, los compuestos inmunomoduladores son 1-oxo- y 1,3 dioxo- 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il) isoindolinas sustituidas con amino en el anillo benzo como se describen en la Patente de Estados Unidos Nro. 5.635.517. Estos compuestos tienen la estructura I:



en la cual uno de X e Y es C=O, el otro de X e Y es C=O, o CH₂, y R² es hidrógeno o alquilo inferior, en particular metilo. Los compuestos inmunomoduladores específicos incluyen, aunque no se limitan a:

1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina;

1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-5-aminoisoindolina;

1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-6-aminoisoindolina;

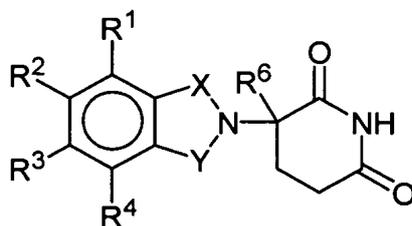
1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-7-aminoisoindolina;

1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina; y

1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-5-aminoisoindolina.

Otros compuestos inmunomoduladores específicos pertenecen a una clase de 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il) ftalimidas sustituidas y 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisoindoles sustituidos, tales como aquellos descritos en las Patentes de

Estados Unidos Nros. 6.281.230; 6.316.471; 6.335.349; y 6.476.052, y WO 98/03502. Los compuestos representativos son de fórmula:



en la cual: uno de X e Y es C=O y el otro de X e Y es C=O, o CH₂;

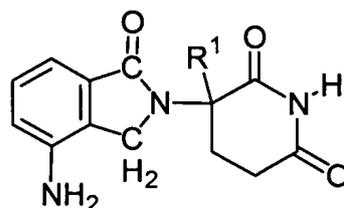
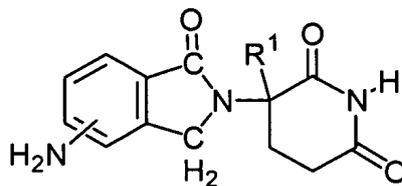
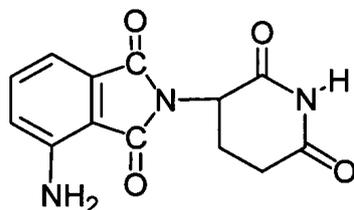
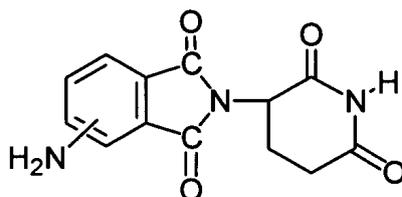
- 5 (i) cada uno de R¹, R², R³, y R⁴, independientemente de los otros, es halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono o (ii) uno de R¹, R², R³, y R⁴ es -NHR⁵ y el resto de R¹, R², R³, y R⁴ son hidrógeno;

R⁵ es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono;

- 10 R⁶ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, bencilo, o halo; siempre que R⁶ sea distinto de hidrógeno si X e Y son C=O y (i) cada uno de R¹, R²,

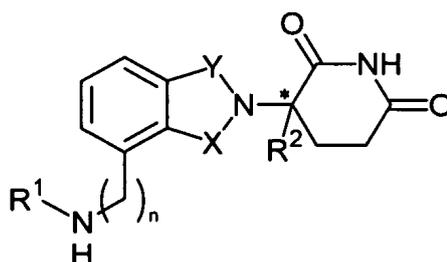
R³, y R⁴ es fluoro o (ii) uno de R¹, R², R³, o R⁴ es amino.

Los compuestos representativos son de las fórmulas:



- 15 en donde R¹ es hidrógeno o metilo. En una forma de realización separada, se abarca el uso de las formas enantioméricamente puras (p. ej. enantiómeros (R) o (S) ópticamente puras) de estos compuestos.

Incluso otros compuestos inmunomoduladores específicos pertenecen a una clase de isoindol-imidas que se divulgan en la Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nros. US 2003/0096841 y US 2003/0045552, y WO 02/059106. Los compuestos representativos son de fórmula II:



II

y las sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico, hidratos, solvatos, clatratos, enantiómeros, diastereómeros, racematos, y mezclas de sus estereoisómeros, en donde: uno de X e Y es C=O y el otro es CH₂ o C=O;

- 5 R¹ es H, alquilo (C₁-C₈), cicloalquilo (C₃-C₇), alquenilo (C₂-C₈), alquinilo (C₂-C₈), bencilo, arilo, alquilo (C0?-C4?)-heterocicloalquilo (C1?-C6?), alquil (C0?-C4?)-heteroarilo (C2?-C5?), C(O)R³, C(S)R³, C(O)OR⁴, alquilo (C1?-C8?)-N(R⁶)₂, alquilo (C1?-C8?)-OR⁵, alquilo (C₁-C₈)-C(O)OR⁵, C(O)NHR³, C(S)NHR³, C(O)NR³R³, C(S)NR³R³ o alquilo (C1?-C8?)-O(CO)R⁵;

R² es H, F, bencilo, alquilo (C1?-C8?), alquenilo (C2?-C8?), o alquinilo (C2?-C8?);

- 10 R³ y R^{3'} son independientemente alquilo (C1?-C8?), cicloalquilo (C3?-C7?), alquenilo (C2?-C8?), alquinilo (C2?-C8?), bencilo, arilo, alquil (C0?-C4?)-heterocicloalquilo (C1?-C6?), alquil (C0?-C4?)-heteroarilo (C2?-C5?), alquil (C0?-C8?)-N(R⁶)₂, alquilo (C1?-C8?)-OR⁵, alquil (C1?-C8?)-C(O)OR⁵, alquilo (C1?-C8?)-O(CO)R⁵, o C(O)OR⁵;

R⁴ es alquilo (C1?-C8?), alquenilo (C2?-C8?), alquinilo (C2?-C8?), alquilo (C1?-C4?)-OR⁵, bencilo, arilo, alquil (C0?-C4?)-heterocicloalquilo (C1?-C6?), o alquilo (C0?-C4?)-heteroarilo (C2?-C5?);

- 15 R⁵ es alquilo (C1?-C8?), alquenilo (C2?-C8?), alquinilo (C2?-C8?), bencilo, arilo, o heteroarilo (C2?-C5?); cada ocurrencia de R⁶ es independientemente H, alquilo (C1?-C8?), alquenilo (C2?-C8?), alquinilo (C2?-C8?), bencilo, arilo, heteroarilo (C2?-C5?), o alquil (C0?-C8?)-C(O)O-R⁵ o los grupos R⁶ pueden unirse para formar un grupo heterocicloalquilo; n es 0 o 1; y

* representa un centro de carbono quiral.

- 20 En los compuestos específicos de fórmula II, cuando n es O entonces R¹ es cicloalquilo (C3?-C7?), alquenilo (C2?-C8?), alquinilo (C2?-C8?), bencilo, arilo, alquil (C0?-C4?)-heterocicloalquilo (C1?-C6?), alquil (C0?-C4?)-heteroarilo (C2?-C5?), C(O)R³, C(O)OR⁴, alquilo (C1?-C8?)-N(R⁶)₂, alquil (C1?-C8?)OR⁵, alquil (C1?-C8?)C(O)OR⁵, C(S)NHR³, o alquil (C1?-C8?)O(CO)R⁵;

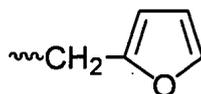
R² es H o alquilo (C1?-C8?); y

- 25 R³ es alquilo (C1?-C8?), cicloalquilo (C3?-C7?), alquenilo (C2?-C8?), alquinilo (C2?-C8?), bencilo, arilo, alquil (C0?-C4?)-heterocicloalquilo (C1?-C6?), alquil (C0?-C4?)-heteroarilo (C2?-C5?), alquil (C5?-C8?)-N(R⁶)₂; alquil (C0?-C8?)-NH-C(O)O-R⁵; alquilo (C1?-C8?)-OR⁵, alquilo (C1?-C8?)-C(O)OR⁵, alquilo (C1?-C8?)-O(CO)R⁵, o C(O)OR⁵; y las otras variables tienen las mismas definiciones.

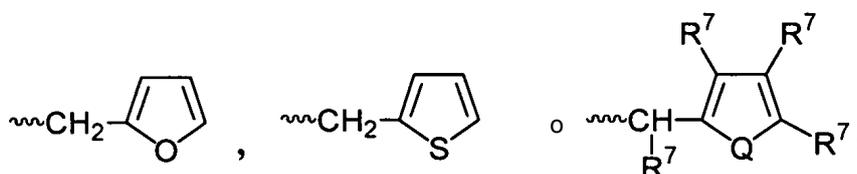
En otros compuestos específicos de fórmula II, R² es H o alquilo (C1?-C4?).

- 30 En otros compuestos específicos de fórmula II, R¹ es alquilo (C1?-C8?) o bencilo.

En otros compuestos específicos de fórmula II, R¹ es H, alquilo (C1?-C8?), bencilo, CH₂OCH₃, CH₂CH₂OCH₃, o



En otra forma de realización de los compuestos de fórmula II, R¹ es



en donde Q es O o S, y cada ocurrencia de R⁷ es independientemente H, alquilo (C1?-C8?), cicloalquilo (C₃-C₇), alqueno (C2?-C8?), alquino (C2?-C8?), bencilo, arilo, halógeno, alquil (C0?-C4?)-heterocicloalquilo (C1?-C6?), alquilo (C0?-C4?)-heteroarilo (C2?-C5?), alquil (C0?-C8?)-N(R⁶)₂, alquil (C1?-C8?)-OR⁵, alquil (C1?-C8?)-C(O)OR⁵, alquil (C1?-C8?)-O(CO)R⁵, o C(O)OR⁵, o las ocurrencias adyacentes de R⁷ pueden tomarse juntas para formar un anillo alquilo o arilo bicíclico.

En otros compuestos específicos de fórmula II, R¹ es C(O)R³.

En otros compuestos específicos de fórmula II, R³ es alquilo (C0?-C4?)-heteroarilo (C2?-C5?), alquilo (C1?-C8?), arilo, o alquil (C0?-C4?)-OR⁵.

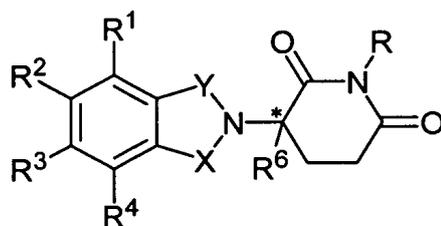
En otros compuestos específicos de fórmula II, el heteroarilo es piridilo, furilo, o tienilo.

10 En otros compuestos específicos de fórmula II, R¹ es C(O)OR⁴.

En otros compuestos específicos de fórmula II, el H de C(O)NHC(O) puede reemplazarse con alquilo (C1?-C4?), arilo, o bencilo.

Ejemplos adicionales de los compuestos en esta clase incluyen, aunque no se limitan a: [2-(2,6-dioxo-piperidin-3-il)-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-4-ilmetil]-amida; ter-butil éster del ácido (2-(2,6-dioxo-piperidin-3-il)-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-4-ilmetil)-carbámico; 4-(aminometil)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolina-1,3-diona; N-(2-(2,6-dioxo-piperidin-3-il)-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-4-ilmetil)-acetamida; N-{{(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil} ciclopropil-carboxamida; 2-cloro-N-{{(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil}acetamida; N-(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)-3-piridilcarboxamida; 3-{1-oxo-4-(bencilamino)isoindolin-2-il}piperidine-2,6-diona; 2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-4-(bencilamino)isoindolina-1,3-diona; N-{{(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil} propanamida; N-{{(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil}-3-piridilcarboxamida; N-{{(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil} heptanamida; N-{{(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil}-2-furilcarboxamida; acetato {N-(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)carbamoil} de metilo; N-(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)pentanamida; N-(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)-2-tienilcarboxamida; N-{{(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil} (butilamino)carboxamida; N-{{(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil} (octilamino)carboxamida; y N-{{(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil}(bencilamino)carboxamida.

Incluso otros compuestos inmunomoduladores específicos pertenecen a una clase de isoindolimididas que se divulgan en Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nro. 2002/0045643, La Publicación Internacional Nro. WO 98/54170, y la Patente de Estados Unidos Nro. 6.395.754. Los compuestos representativos son de fórmula III:



III

y las sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico, hidratos, solvatos, clatratos, enantiómeros, diastereómeros, racematos, y mezclas de sus estereoisómeros, en donde: uno de X e Y es C=O y el otro es CH₂ o C=O;

R es H o CH₂OCOR';

(i) cada uno de R¹, R², R³, o R⁴, independientemente de los otros, es halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono o (ii) uno de R¹, R², R³, o R⁴ es nitro o -NHR⁵ y el resto de R¹, R², R³, o R⁴ son hidrógeno;

40 R⁵ es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 carbonos

R⁶ hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro, o fluoro;

R' es R⁷-CHR¹⁰-N(R⁸R⁹);

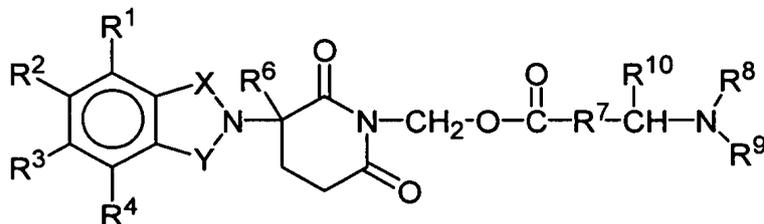
R⁷ es m-fenileno o p-fenileno o -(C_nH_{2n})- en el cual n tiene un valor de 0 a 4; cada uno de R⁸ y R⁹ tomados independientemente del otro es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o R⁸ y R⁹ tomados juntos es tetrametileno, pentametileno, hexametileno, o -CH₂CH₂XiCH₂CH₂- en la cual Xi es -O-, -S-, o -NH-;

45

R¹⁰ es hidrógeno, alquilo de a 8 átomos de carbono, o fenilo; y

* representa un centro de carbono quiral.

Otros compuestos representativos son de fórmula:



5 en donde: uno de X e Y es C=O y el otro de X e Y es C=O o CH₂;

(i) cada uno de R¹, R², R³, o R⁴, independientemente de los otros, es halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono o (ii) uno de R¹, R², R³, y R⁴ es -NHR⁵ y el resto de R¹, R², R³, y R⁴ son hidrógeno;

R⁵ es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono;

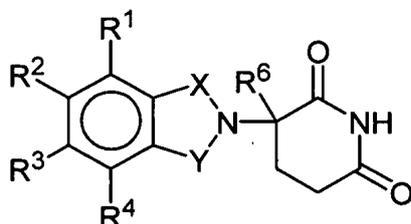
10 R⁶ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro, o fluoro;

R⁷ es m-fenileno o p-fenileno o -(C_nH_{2n})- en el cual n tiene un valor de 0 a 4;

cada uno de R⁸ y R⁹ tomados independientemente del otro es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o R⁸ y R⁹ tomados juntos es tetrametileno, pentametileno, hexametileno, o -CH₂CH₂X¹CH₂CH₂- en la cual X¹ es -O-, -S-, o -NH-;

15 R¹⁰ es hidrógeno, alquilo de a 8 átomos de carbono, o fenilo.

Otros compuestos representativos son de fórmula:

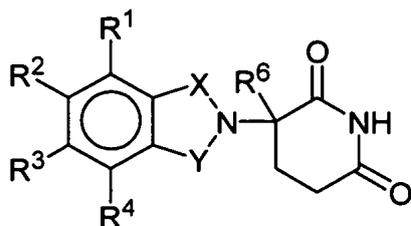


en la cual uno de X e Y es C=O y el otro de X e Y es C=O o CH₂;

20 cada uno de R¹, R², R³, y R⁴, independientemente de los otros, es halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono o (ii) uno de R¹, R², R³, y R⁴ es nitro o amino protegido y el resto de R¹, R², R³, y R⁴ son hidrógeno; y

R⁶ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro, o fluoro.

Otros compuestos representativos son de fórmula:



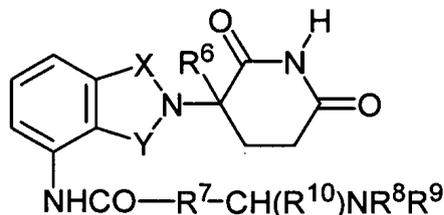
25 en la cual: uno de X e Y es C=O y el otro de X e Y es C=O o CH₂;

(i) cada uno de R¹, R², R³, y R⁴, independientemente de los otros, es halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono o (ii) uno de R¹, R², R³, y R⁴ es -NHR⁵ y el resto de R¹, R², R³, y R⁴ son hidrógeno;

R^5 es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o $CO-R^7-CH(R^{10})NR^8R^9$ en la cual cada uno de R^7 , R^8 , R^9 , y R^{10} es como se define en la presente; y

R es alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro, o fluoro.

Ejemplos específicos de los compuestos son de fórmula:



5

en la cual: uno de X e Y es C=O y el otro de X e Y es C=O o CH_2 ;

R^6 es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, bencilo, cloro, o fluoro;

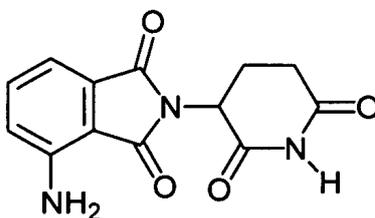
R^7 es m-fenileno, p-fenileno o $-(C_nH_{2n})-$ en el cual n tiene un valor de 0 a 4; cada uno de R^8 y R^9 tomados independientemente del otro es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o R^8 y R^9 tomados juntos es tetrametileno, pentametileno, hexametileno, o $-CH_2CH_2X^1CH_2CH_2-$ en la cual X^1 es $-O-$, $-S-$ o $-NH-$; y

10

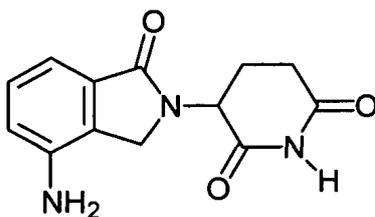
R^{10} es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o fenilo.

15

Los compuestos inmunomoduladores más preferidos are 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolina-1,3-diona y 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidin-2,6-diona. Los compuestos pueden obtenerse por medio de Métodos de síntesis estándar (véase p. ej., Patente de Estados Unidos Nro. 5.635.517). Los compuestos están disponibles de Celgene Corporation, Warren, NJ. 4-(Amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolina-1,3-diona tiene la siguiente estructura química:



El compuesto 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidin-2,6-diona tiene la siguiente estructura química:



20 En otra forma de realización, los compuestos inmunomoduladores específicos abarcan las formas polimórficas de 3-(4-amino-1-oxo-1,3 dihidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona tales como la Forma A, B, C, D, E, F, G y H, que se divulgan en la Publicación de Estados Unidos Nro. US 2005/0096351 A1. Por ejemplo, la Forma A de 3-(4-amino-1-oxo-1,3 dihidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona es un material cristalino no solvatado que puede obtenerse de sistemas disolventes no acuosos. La Forma A tiene un patrón de difracción por rayos X del polvo que comprende picos significativos a aproximadamente 8, 14,5, 16, 17,5, 20,5, 24 y 26 grados $2^\circ C$, y tiene una temperatura máxima de fusión por calorimetría de barrido diferencial de alrededor de $270^\circ C$. La Forma A es débilmente o no higroscópica y resulta ser el polimorfo anhidro más termodinámicamente estable de 3-(4-amino-1-oxo-1,3 dihidro-isoindol-2-il)-piperidin-2,6-diona descubierta hasta ahora.

25

30 La Forma B de 3-(4-amino-1-oxo-1,3 dihidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona es un material cristalino semi-hidratado que puede obtenerse de varios sistemas disolventes, incluyendo, pero sin limitarse a, hexano, tolueno, y agua. La Forma B tiene un patrón de difracción por rayos X del polvo que comprende picos significativos a aproximadamente 16, 18, 22 y 27 grados $2^\circ C$, y tiene endotermias de la curva de DSC de alrededor de 146 y $268^\circ C$, cuya deshidratación y fusión se identifican por experimentos por microscopio en etapa caliente. Los estudios de

30

interconversión muestran que la Forma B se convierte en la Forma E en sistemas disolventes acuosos, y se convierte en otras formas en acetona y otros sistemas anhidros.

La Forma C de 3-(4-amino-1-oxo-1,3 dihidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona es un material cristalino semi solvatado que puede obtenerse de disolventes tales como, pero sin limitarse a, acetona. La Forma C tiene un patrón de difracción por rayos X del polvo que comprende picos significativos a aproximadamente 15,5 y 25 grados 2°C , y tiene una temperatura máxima de fusión por calorimetría de barrido diferencial de alrededor de 269°C . La Forma C no es higroscópica por debajo de alrededor de 85% RH, pero puede convertirse en la Forma B con humedades relativas más altas.

La Forma D de 3-(4-amino-1-oxo-1,3 dihidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona es un poliformo solvatado cristalino preparado de una mezcla de acetonitrilo y agua. La Forma D tiene un patrón de difracción por rayos X del polvo que comprende picos significativos a aproximadamente 27 y 28 grados 2°C , y tiene una temperatura máxima de fusión por calorimetría de barrido diferencial de alrededor de 270°C . La Forma D es o bien débilmente o no higroscópica, pero normalmente se convertirá en la Forma B cuando se tensiona con humedades relativas más altas.

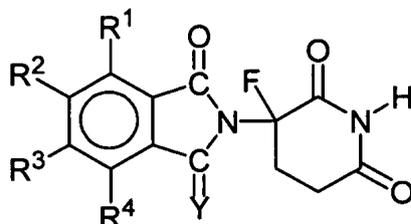
La Forma E de 3-(4-amino-1-oxo-1,3 dihidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona es un material cristalino, dihidratado que puede obtenerse por emulsión 3-(4-amino-1-oxo-1,3 dihidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona en agua y mediante una evaporación lenta de 3-(4-amino-1-oxo-1,3 dihidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona en un sistema disolvente con una proporción de alrededor de 9:1 acetona:agua. La Forma E tiene un patrón de difracción por rayos X del polvo que comprende picos significativos a aproximadamente 20, 24,5 y 29 grados 2θ , y tiene una temperatura máxima de fusión por calorimetría de barrido diferencial de alrededor de 269°C . La Forma E puede convertirse en la Forma C en un sistema disolvente de acetona y en la Forma G en un sistema disolvente por THF. En sistemas disolventes acuosos, la Forma E resulta ser la forma más estable. Los experimentos de desolvatación realizados sobre la Forma E muestran que luego de calentar a alrededor de 125°C durante alrededor de cinco minutos, la Forma E puede convertirse en la Forma B. Tras calentar a 175°C durante alrededor de cinco minutos, la Forma B puede convertirse en la Forma F.

La Forma F de 3-(4-amino-1-oxo-1,3 dihidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona es un material cristalino no solvatado que puede obtenerse de la deshidratación de Forma E. La Forma F tiene un patrón de difracción por rayos X del polvo que comprende picos significativos a aproximadamente 19, 19,5 y 25 grados 2°C , y tiene una temperatura máxima de fusión por calorimetría de barrido diferencial de alrededor de 269°C .

La Forma G de 3-(4-amino-1-oxo-1,3 dihidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona es un material cristalino no solvatado que puede obtenerse de la emulsión de las Formas B y E en un disolvente tal como, pero sin limitarse a, tetrahidrofurano (THF). La Forma G tiene un patrón de difracción por rayos X del polvo que comprende picos significativos a aproximadamente 21, 23 y 24,5 grados 2°C , y tiene una temperatura máxima de fusión por calorimetría de barrido diferencial de alrededor de 267°C .

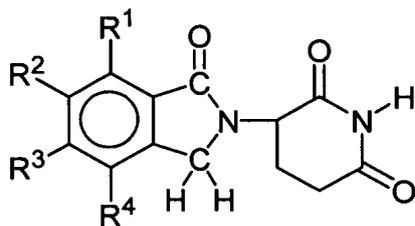
Forma H de 3-(4-amino-1-oxo-1,3 dihidro-isoindol-2-il)-piperideno-2,6-diona es un material cristalino parcialmente hidratado (alrededor de 0,25 moles) que puede obtenerse mediante la exposición de la Forma E al 0 % de humedad relativa. La Forma H tiene un patrón de difracción por rayos X del polvo que comprende picos significativos a aproximadamente 15, 26 y 31 grados 2°C , y tiene una temperatura máxima de fusión por calorimetría de barrido diferencial de alrededor de 269°C .

Otros compuestos inmunomoduladores específicos usable en los métodos se proporciona en la presente incluyen, aunque no se limitan a, 1-oxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidin-3il) isoindolinas y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidin-3-il) isoindolinas tales como aquellas descritas en las Patentes de Estados Unidos Nros. 5.874.448 y 5.955.476. Los compuestos representativos son de fórmula:



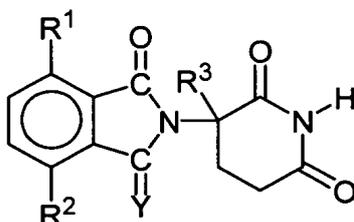
en donde Y es oxígeno o H^2 y cada uno de R^1 , R^2 , R^3 , y R^4 , independientemente de los otros, es hidrógeno, halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, o amino.

Otros compuestos inmunomoduladores específicos utilizables en los métodos se proporciona en la presente incluyen, aunque no se limitan a, las 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisoindolinas tetrasustituidas que se describen en la Patente de Estados Unidos Nro. 5.798.368. Los compuestos representativos son de fórmula:



en donde cada uno de R^1 , R^2 , R^3 , y R^4 , independientemente de los otros, es halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono.

- 5 Otros compuestos inmunomoduladores específicos que pueden usarse en los métodos se proporcionan en la presente incluyen, aunque no se limitan a, 1-oxo y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl) isoindolinas divulgadas en la Patente de Estados Unidos Nro. 6.403.613. Los compuestos representativos son de fórmula:

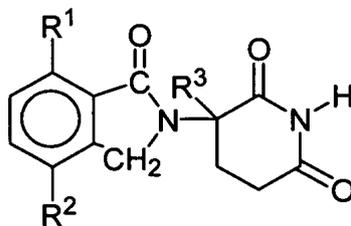


en la cual

- 10 Y es oxígeno o H_2 , uno primero de R^1 y R^2 es halo, alquilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, ciano, o carbamoilo, el segundo de R^1 y R^2 , independientemente del primero, es hidrógeno, halo, alquilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, ciano, o carbamoilo, y

R^3 es hidrógeno, alquilo, o bencilo.

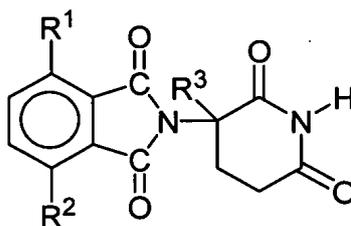
Ejemplos específicos de los compuestos son de fórmula:



- 15 en donde uno primero de R^1 y R^2 es halo, alquilo de desde 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de desde 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino en la cual cada alquilo es de desde 1 a 4 átomos de carbono, ciano, o carbamoilo, el segundo de R^1 y R^2 , independientemente del primero, es hidrógeno, halo, alquilo de desde 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de desde 1 a 4 átomos de carbono, alquilamino en la cual el alquilo es de desde 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino en la cual cada alquilo es de desde 1 a 4 átomos de carbono, ciano, o carbamoilo, y

- 20 R^3 es hidrógeno, alquilo de desde 1 a 4 átomos de carbono, o bencilo. Ejemplos específicos incluyen, aunque no se limitan a, 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-4-metilisoindolina.

Otros compuestos que pueden usarse en los métodos se proporcionan en la presente de fórmula:

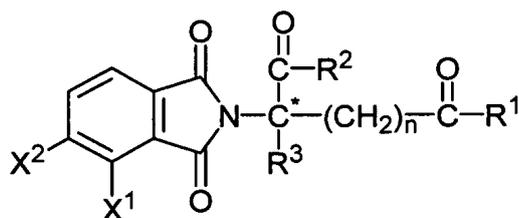


- 25 en donde uno primero de R^1 y R^2 es halo, alquilo de desde 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de desde 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino en la cual cada alquilo es de desde 1 a 4 átomos de carbono, ciano, o carbamoilo, el

segundo de R^1 y R^2 , independientemente del primero, es hidrógeno, halo, alquilo de desde 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de desde 1 a 4 átomos de carbono, alquilamino en la cual el alquilo es de desde 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino en la cual cada alquilo es de desde 1 a 4 átomos de carbono, ciano, o carbamoilo, y

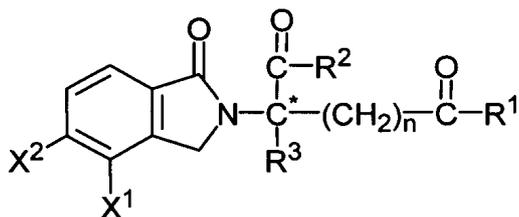
R^3 es hidrógeno, alquilo de desde 1 a 4 átomos de carbono, o bencilo.

- 5 Otros compuestos inmunomoduladores específicos que pueden usarse en los métodos se proporciona en la presente incluyen, aunque no se limitan a, 1-oxo y 1,3-dioxoisindolinas sustituidas en la posición 4 o 5 del anillo de indolina que se describen en la Patente de Estados Unidos Nro. 6.380.239 y la Publicación de la Solicitud de Estados Unidos Nro. 2006/0084815. Los compuestos representativos son de fórmula:



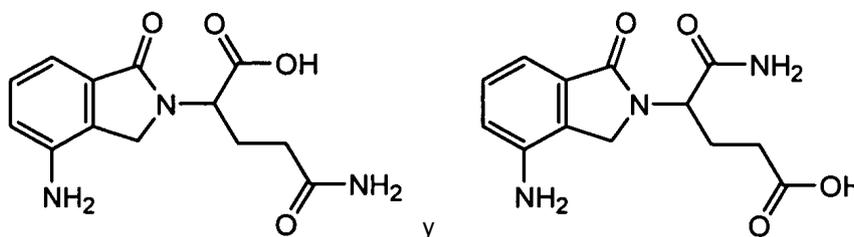
- 10 en la cual el átomo de carbono designado C^* constituye un centro de quiralidad (cuando n no es cero y R^1 no es igual que R^2); uno de X^1 y X^2 es amino, nitro, alquilo de uno a seis carbonos, o $NH-Z$, y el otro de X^1 o X^2 es hidrógeno; cada uno de R^1 y R^2 independientemente del otro, es hidroxilo o $NH-Z$; R^3 es hidrógeno, alquilo de uno a seis carbonos, halo, o haloalquilo; Z es hidrógeno, arilo, alquilo de uno a seis carbonos, formilo, o acilo de uno a seis carbonos; y n tiene un valor de 0, 1, o 2; siempre que si X^1 es amino, y n es 1 o 2, entonces R^1 y R^2 no son ambos hidroxilo; y las sales de los anteriores.

Los compuestos adicionales que pueden usarse en los métodos se proporcionan en la presente de fórmula:

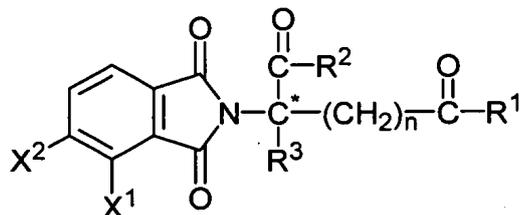


- 20 en la cual el átomo de carbono designado C^* constituye un centro de quiralidad cuando n no es cero y R^1 no es R^2 ; uno de X^1 y X^2 es amino, nitro, alquilo de uno a seis carbonos, o $NH-Z$, y el otro de X^1 o X^2 es hidrógeno; cada uno de R^1 y R^2 independientemente del otro, es hidroxilo o $NH-Z$; R^3 es alquilo de uno a seis carbonos, halo, o hidrógeno; Z es hidrógeno, arilo o un alquilo o acilo de uno a seis carbonos; y n tiene un valor de 0, 1, o 2.

- 25 Ejemplos específicos de compuestos que pueden usarse en los métodos se proporciona en la presente incluyen, aunque no se limitan a, ácido 2-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-4-carbamoil-butírico y ácido 4-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-4-carbamoil-butírico, que tienen las siguientes estructuras, respectivamente, y las sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico, solvatos, prodrugas, y estereoisómeros de los anteriores:

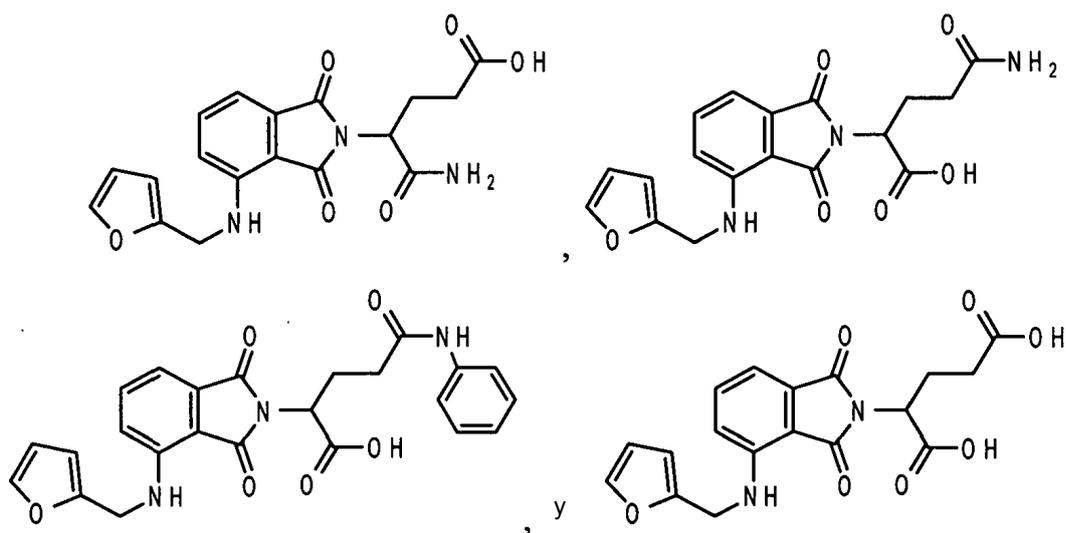


Otros compuestos representativos son de fórmula:

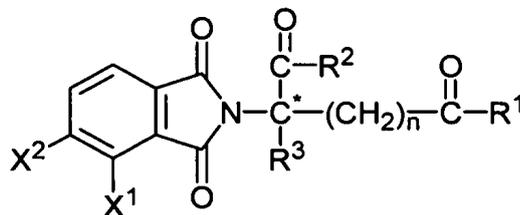


5 en la cual el átomo de carbono designado C* constituye un centro de quiralidad cuando n no es cero y R¹ no es R²; uno de X¹ y X² es amino, nitro, alquilo de uno a seis carbonos, o NH-Z, y el otro de X¹ o X² es hidrógeno; cada uno de R¹ y R² independientemente del otro, es hidroxilo o NH-Z; R³ es alquilo de uno a seis carbonos, halo, o hidrógeno; Z es hidrógeno, arilo, o un alquilo o acilo de uno a seis carbonos; y n tiene un valor de 0, 1, o 2; y las sales de los anteriores.

10 [0190] Ejemplos específicos incluyen, aunque no se limitan a, ácido 4-carbamoil-4-{4-[(furan-2-il- metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il} -butírico, 4-carbamoil-2-{4- [(furan-2-il-metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il}-butírico ácido, ácido 2-{4-[(furan- 2-il-metil)-amino] - 1,3 -dioxo- 1,3 -dihidro-isoindol-2-il} -4-fenilcarbamoil-butírico, y ácido 2- {4- [(furan-2-il-metil)-amino] - 1,3 -dioxo- 1,3 -dihidro-isoindol-2-il} -pentandioico, que tienen las siguientes estructuras, respectivamente, y las sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico, solvato, prodrugas, y estereoisómeros de los anteriores:



15 Otros ejemplos específicos de los compuestos son de fórmula:



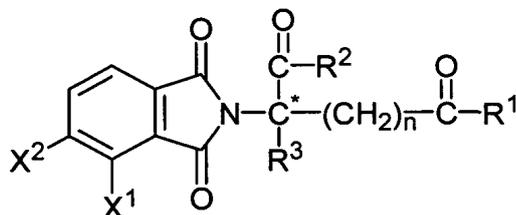
en donde uno de X¹ y X² es nitro, o NH-Z, y el otro de X¹ o X² es hidrógeno; cada uno de R¹ y R², independientemente del otro, es hidroxilo o NH-Z; R³ es alquilo de uno a seis carbonos, halo, o hidrógeno;

Z es hidrógeno, fenilo, un acilo de uno a seis carbonos, o un alquilo de uno a seis carbonos; y

20 n tiene un valor de 0, 1, o 2;

siempre que si uno de X¹ y X² es nitro, y

n es 1 o 2, entonces R¹ y R² son distintos de hidroxilo; y si -COR² y -(CH₂)ⁿCOR¹ son diferentes, el átomo de carbono designado C* constituye un centro de quiralidad. Otros compuestos representativos son de fórmula:



5 en donde uno de X¹ y X² es alquilo de uno a seis carbonos; cada uno de R¹ y R², independientemente del otro, es hidroxilo o NH-Z;

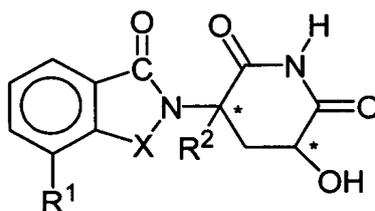
R³ es alquilo de uno a seis carbonos, halo, o hidrógeno;

Z es hidrógeno, fenilo, un acilo de uno a seis carbonos, o un alquilo de uno a seis carbonos; y

n tiene un valor de 0, 1, o 2; y

si -COR² y -(CH₂)ⁿCOR¹ son diferentes, el átomo de carbono designado C* constituye un centro de quiralidad.

10 Incluso otros compuestos inmunomoduladores específicos incluyen, aunque no se limitan a, isoindolina-1-ona y isoindolina-1,3-diona sustituida en la posición 2 con 2,6-dioxo-3- hidroxipiperidin-5-il que se describen en la Patente de Estados Unidos Nro. 6.458.810. Los compuestos representativos son de fórmula:



en donde: los átomos de carbono designados * constituyen centros de quiralidad;

15 X es -C(O)- o -CH₂-;

R¹ es alquilo de 1 a 8 átomos de carbono o -NHR³;

R² es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o halógeno; y

R³ es hidrógeno,

20 alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, no sustituido o sustituido con alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halo, amino, o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 18 átomos de carbono, fenilo, no sustituido o sustituido con alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halo, amino, o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono, bencilo, no sustituido o sustituido con alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halo, amino, o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono, o -COR⁴ en la cual

25 R⁴ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, no sustituido o sustituido con alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halo, amino, o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 18 átomos de carbono, fenilo, no sustituido o sustituido con alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halo, amino, o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono, o bencilo, no sustituido o sustituido con alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halo, amino, o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono.

30 Compuestos se proporciona en la presente pueden o bien adquirirse en el comercio o prepararse de acuerdo con los métodos descritos en las patentes o las publicaciones de patente divulgadas en este documento. Además, los compuestos ópticamente puros pueden sintetizarse en forma asimétrica o resolverse mediante la utilización de agentes de resolución conocidos o columnas quirales además de otras técnicas estándar de química orgánica sintética.

35 Varios compuestos inmunomoduladores contienen uno o más centros quirales, y pueden existir como mezclas racémicas de enantiómeros o mezclas de diastereómeros. Se abarca el uso de formas estereoméricamente pura de dichos compuestos, además del uso de mezclas de aquellas formas. Por ejemplo, mezclas que comprende cantidades iguales o no iguales de los enantiómeros de los compuestos inmunomoduladores particulares pueden usarse en los métodos y las composiciones proporcionadas en este documento. Estos isómeros pueden sintetizarse

asimétricamente o resolverse mediante la utilización de técnicas estándar tales como columnas quirales o agentes de resolución quirales. Véase, p. ej., Jacques, J., et al, *Enantiómeros, Racematos and Resolutions* (Wiley-Interscience, New York, 1981); Wilen, S. H., et al, *Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, E. L., *Stereochemistry de Carbon Compuestos* (McGraw-Hill, NY, 1962); y Wilen, S. H., *Tables de Resolving Agents and Optical Resolutions* p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. de Notre Dame Press, Notre Dame, IN, 1972).

Debe observarse que si hay una dependencia entre una estructura que se ejemplifica y un nombre que recibe esa estructura, la estructura que se ejemplifica tendrá más peso. Además, si la estereoquímica de una estructura o una porción de una estructura no se indica con, por ejemplo, líneas negritas o intermitentes, la estructura o la porción de la estructura se interpretará como abarcativa de todos los estereosómeros de la misma.

5.9. Administración de las células PINK, Perfusato placentario humana, o Células asesinas naturales combinadas

Las células PINK, células de perfusato placentario humano, células asesinas naturales combinadas, poblaciones de células que comprende dichas células, o combinaciones de los anteriores, pueden administrarse a un individuo, p. ej., un individuo que tiene las células tumorales, p. ej., un paciente con cáncer, mediante cualquier vía médicamente aceptable conocida en el arte apropiado para la administración de células vivas. En varias formas de realización, las células se proporcionan en la presente pueden implantarse quirúrgicamente, inyectarse, infundirse, p. ej., por medio de un catéter o una jeringa, o administrarse de otro modo directamente o indirectamente al sitio que necesita reparación o aumento. En una forma de realización, las células se administran a un individuo por vía intravenosa. En otra forma de realización, las células se administran al individuo en el sitio de un tumor, p. ej., un tumor sólido. En una forma de realización específica en la cual el individuo tiene un tumor en más que un sitio, las células se administran hasta al menos dos, o todos, los sitios del tumor. En ciertas otras formas de realización, las células proporcionadas en este documento, o las composiciones que comprenden las células, se administran por vía oral, nasal, intraarterial, parenteral, oftálmica, intramuscular, subcutánea, intraperitoneana, intracerebral, intraventricular, intracerebroventricular, intratecal, intracisternal, intraespinal y/o perispinal. En ciertas formas de realización específicas, las células se administran por a través de agujas y/o catéteres intracraneales o intravertebrales y/o con o sin dispositivos de bombeo.

Las células PINK, células de perfusato placentario humano, células asesinas naturales combinadas, o combinaciones de los anteriores, o poblaciones celulares que comprende dichas células, pueden administrarse a un individuo en una composición, p. ej., una matriz, hidrogel, armazón proteico, o lo similar que comprenden las células.

En una forma de realización, las células se proporcionan en la presente sembradas sobre una matriz celular, p. ej., un material biológico placentario tales como un material de membrana amniótica. Dicho material de membrana amniótica puede ser, p. ej., la membrana amniótica diseccionada directamente de la placenta de un mamífero; la membrana amniótica fija o tratada con calor, la membrana amniótica sustancialmente seca (es decir, <20% de H₂O), la membrana coriónica, la membrana coriónica sustancialmente seca, la membrana amniótica y coriónica sustancialmente secas, y lo similar. Los materiales biológicos placentarios preferidos sobre los cuales las células madre placentarias pueden sembrarse se describen en Hariri, *Publicación de la Solicitud de Estados Unidos Nro. 2004/0048796*.

En otra forma de realización, las células PINK, células de perfusato placentario humano, células asesinas naturales combinadas, o combinaciones de los anteriores, o poblaciones celulares que comprende dichas células, se suspenden en una solución de hidrogel para, p. ej., inyección. Los hidrogeles apropiados para dichas composiciones incluyen péptidos auto-portantes, tales como RAD 16. En una forma de realización, una solución de hidrogel que comprende las células puede dejarse endurecer, por ejemplo en un molde, para formar una matriz que tiene células dispersas en su interior para implantación. Las células presentes en dicha matriz también pueden cultivarse de manera tal que las células son se expanden mitóticamente antes de la implantación. El hidrogel puede ser, por ejemplo, un polímero orgánico (natural o sintético) que está entrecruzado por medio de uniones covalentes, iónicas o por hidrógeno para crear una estructura en retículo abierto tridimensional que atrapa moléculas de agua para formar un gel. Los materiales que forman hidrogel incluyen polisacáridos tales como alginato y sus sales, péptidos, polifosfazinas, y poliácridatos, que están entrecruzados iónicamente, o copolímeros de bloqueo tales como copolímeros en bloque de óxido de etileno-polipropilenglicol que están entrecruzados mediante la temperatura o el pH, respectivamente. En algunas formas de realización, el hidrogel o la matriz de la invención son biodegradables.

En algunas formas de realización de la invención, la formulación comprende un gel polimerizable in situ (véase, p. ej., la *Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos 2002/0022676*; Anseth et al., *J. Control Release*, 78(1-3): 199-209 (2002); Wang et al., *Biomaterials*, 24(22):3969-80 (2003).

En algunas formas de realización, los polímeros son al menos parcialmente solubles en soluciones acuosas, tales como agua, soluciones salinas tamponadas, o soluciones alcohólicas acuosas, que tienen grupos laterales cargados, o una de sus sales iónicas monovalentes. Ejemplos de polímeros que tienen grupos laterales ácidos que pueden tratarse con los cationes son poli(fosfazenos), poli(ácidos acrílicos), poli(ácidos metacrílicos), copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, poli(vinil acetato), y polímeros sulfonados, tales como poliestireno sulfonado. Copolímeros que tienen grupos laterales ácidos formados mediante la reacción ácido acrílico o metacrílico y monómeros o polímeros de éter vinílico también pueden usarse. Los ejemplos de grupos ácidos son grupos ácido

carboxílico, grupos ácido sulfónico, grupos alcohólicos halogenados (preferentemente fluorados), grupos OH fenólicos, y grupos OH ácidos.

5 Las células madre placentarias de la invención o sus co-cultivos pueden sembrarse en el marco o armazón proteico tridimensional e implantarse in vivo. Dicho marco puede implantarse en combinación con cualquiera de uno más factores de crecimiento, células, fármacos u otros componentes que estimulan la formación de tejidos o potencian o mejoran de otro modo la práctica de la invención.

10 Ejemplos de armazones proteicos que pueden usarse en la presente invención incluyen almohadillas no tejidas, espumas porosas, o péptidos autoportantes. Las almohadillas no tejidas pueden formarse mediante la utilización de fibras formadas por un copolímero sintético susceptible de absorberse de ácidos láctico y glicólico (p. ej., PGA/PLA) (VICRILLO, Ethicon, Inc., Somerville, N.J.). Las espumas, compuestas por, p. ej., copolímero poli(ε-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), formado mediante procesos tales como liofilización, o liofilización (véase, p. ej., Pat. de los Estados Unidos Nro. 6.355.699), también puede usarse como armazones proteicos.

15 Las células madre placentarias de la invención también pueden sembrarse sobre, o contactarse con, un material cerámico aceptable desde el punto de vista fisiológico incluyendo, pero sin limitarse a, fosfato de mono-, di-, tri-, alfa-tri-, beta-tri-, y tetra-calcio, hidroxiapatita, fluoroapatitas, sulfatos de calcio, fluoruros de calcio, óxidos de calcio, carbonatos de calcio, fosfato de calcio y magnesio, vidrios biológicamente activos tales como BIOGLAS S[®], y mezclas de los anteriores. Los materiales cerámicos biocompatibles actualmente disponibles en el mercado incluyen SURGIBONE[®] (CanMedica Corp., Canadá), ENDOBON[®] (Merck Biomaterial France, Francia), CEROS[®] (Matis, AG, Bettlach, Suiza), y productos de injerto óseo con colágeno mineralizado tales como HEALOS[™] (DePuy, Inc., Raynham, MA) y VITOSS[®], RHAKOSS[™], y CORTOSS[®] (Orthovita, Malvern, Pa.). La estructura puede ser una mezcla, amalgama o compuesto de materiales naturales y/o sintéticos.

20 En otra forma de realización, las células madre placentarias pueden sembrarse sobre, o contactarse con, un fieltro, que puede estar, p. ej., compuesto por una hebra de multifilamento hecha de un material bioabsorbible tales como PGA, PLA, PCL copolímeros o amalgamas, o ácido hialurónico.

25 Las células madre placentarias de la invención pueden, en otra forma de realización, sembrarse sobre armazones proteicos de espuma que pueden ser estructuras compuestas. Dichos armazones proteicos de espuma pueden moldearse en una forma útil, tal como la de una porción de una estructura específica en el cuerpo que se reparará, reemplazará o aumentará. En algunas formas de realización, la estructura se trata, p. ej., con ácido acético 0,1M seguido de incubación en polilisina, PBS, y/o colágeno, antes de la inoculación de las células de la invención con el fin de potenciar la unión celular. Las superficies externas de una matriz pueden modificarse para mejorar la unión o el crecimiento de las células y la diferenciación de tejido, tal como mediante recubrimiento de la matriz con plasma, o la incorporación de una o más proteínas (p. ej., colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (p. ej., sulfato de heparina, sulfato-4- de condroitina, sulfato-6- de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de queratina, etc.), una matriz celular, y/u otros materiales tales como, pero sin limitarse a, gelatina, alginatos, agar, agarosa, y gomas vegetales, y lo similar.

35 En algunas formas de realización, el armazón proteico comprende, o se trata con, materiales que lo convierten en no trombogénico. Estos tratamientos y materiales también pueden promover o mantener el crecimiento endotelial, la migración y la deposición de la matriz extracelular. Algunos ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, aunque no se limitan a, materiales naturales tales como proteínas de la membrana de base tales como laminina y colágeno Tipo IV, materiales sintéticos tales como EPTFE, y siliconas de polietanurea segmentada, tales como PURSPAN[™] (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif.). El armazón proteico también puede comprender anti-agentes trombóticos tales como heparina; los armazones proteicos también pueden tratarse para alterar la carga superficial (p. ej., recubrimiento con plasma) antes de sembrar con las células madre placentarias.

6. Ejemplos

45 6.1. Ejemplo 1: Caracterización de células asesinas naturales intermedias derivadas de placenta del perfusato placentario y la sangre del cordón umbilical

The presente ejemplo demuestra el aislamiento y el cultivo de células asesinas naturales de perfusato placentario humano.

50 Aislamiento de células asesinas naturales de la placenta. Las células asesinas naturales se aislaron de 8 unidades de perfusato placentario humano (HPP), y de 4 unidades de la sangre del cordón umbilical (UCB), mediante la utilización de microperlas conjugadas con CD56. El aislamiento de las células PINK se condujo mediante selección con perlas magnéticas (Miltenyi Biotec). La placenta post parto se exsanguinó y se perfundió con alrededor de 200 hasta alrededor de 750 ml de solución de perfusión (solución para inyección de NaCl al 0,9% Grado USP (Cat No. 68200-804, VWR). El perfusato no procesado se recolectó y se procesó para retirar los eritrocitos. Las células mononucleares de HPP o UCB se lavaron una vez con buffer para clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) (RPMI 1640, sin rojo fenol, más 5% FBS), luego se centrifugaron a 1500 rpm durante 6 minutos. El número de células se recontó, y las escamas celulares se suspendieron nuevamente en 80 µl de buffer

por 10^7 células totales con 20 μ l de microperlas CD3 (Nro. de Catálogo 130-050-101, Miltenyi). El sistema se mezcló bien y se incubó durante 15 minutos a 4-8°C. Se agregó 1-2 ml de buffer por 10^7 células totales, y la mezcla luego se centrifugó a 300 g durante 10 minutos. El sobrenadante se eliminó con pipeta completamente. Las escamas celulares se suspendieron nuevamente hasta 10 células en 500 μ l de buffer y se prepararon para la separación magnética. Una columna de LS (Miltenyi Biotec) se colocó en el campo magnético de un separador celular MIDIMACS™ (Miltenyi Biotec), se aplicó 3 ml de buffer para enjuagar la columna, y la suspensión celular/microperlas se aplicó a la columna. Las células CD3⁻ no marcadas, que se pasaron a través de la columna, y que incluirían células asesinas naturales, se recolectaron, junto con 2 x 3 ml de buffer de lavado. Las células CD3⁻ se recontaron, se lavaron una vez, luego se tiñeron con microperlas de CD56 (Cat#: 130-050-401, Miltenyi), y se separaron/aislaron mediante la utilización de los mismos protocolos de acuerdo con la separación de microperlas CD3 descritos con anterioridad. Una población de CD56⁺CD3⁻ se recolectó así y estaba lista para análisis adicional. El rango de porcentaje de células asesinas naturales fue de 3,52 a 11,6 (mediana 6,04, promedio 5,22) en HPP, y 1,06 a 8,44 en UCB (mediana: 3,42, promedio: 4,2). La selección de microperlas CD56 de células asesinas naturales de HPP produjeron una población que era aproximadamente 80% pura. Véase la FIG. 1. Entre la población de células asesinas naturales completas CD56⁺, CD3⁻, el rango de porcentaje de células asesinas naturales CD56⁺, CD16⁻ (es decir, las células PINK) fue 56,6 a 87,2 (mediana 74,2, promedio 65,5) de HPP, y 53,7 a 96,6 (mediana 72,8) de UCB. El rango de porcentaje de células asesinas naturales CD56⁺, CD16⁺ fue de 12,8 a 43,3 (mediana 25,8, promedio 34,5) de HPP, y 3,4 a 46,3 (mediana 27,3, promedio 33,4) para UCB.

En otros experimentos, las células asesinas naturales se aislaron mediante la utilización de un kit de selección magnética negativa que se orienta a los antígenos de la superficie celular sobre las células sanguíneas humanas (CD3, CD4, CD 14, CD 19, CD20, CD36, CD66b, CD 123, HLA-DR, glicoforina A). Las unidades HPP y UCB crioconservadas se descongelaron y se diluyeron a 1:1 con medio de descongelamiento (Medio RPMI 1640 (Catálogo #22400, Gibco) más 20% Suero de Feto de Bovino Inactivado con Calor (Catálogo #SH30070.03, Hyclone)) y centrifugado a 1500 rpm durante 8 minutos. El sobrenadante se retiró y el tratamiento con cloruro de amonio se aplicó para desproveer adicionalmente los eritrocitos; cada unidad se suspendió nuevamente en aproximadamente 30 ml de buffer FACS enfriado con hielo (RPMI 1640, sin rojo fenol, más 5% FBS), y luego se agregó 60 ml de cloruro de amonio enfriado con hielo (Catálogo #07850, Stem Cell), la solución se pasó por vórtex y luego se incubó sobre hielo durante 5 minutos. Las células mononucleares luego se lavaron con buffer FACS 3 veces y luego se centrifugaron a 1500 rpm durante 8 minutos. El número de células se recontó y las escamas celulares se suspendieron nuevamente en 5×10^7 células vivas/ml en Buffer RoboSep (Catálogo #20104, Stem Cell) más 0,1 mg/ml de solución de DNAase I (Catálogo #07900, Stem Cell) se agregó a la suspensión celular, se mezcló suavemente por pipeta y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente antes del aislamiento. Se retiraron los coágulos de la suspensión celular por filtrado con 40 μ m separador de cepas de nylon en malla (Catálogo # 352340, BD Falcon) antes de proceder al aislamiento. El aislamiento se automatiza por el dispositivo RoboSep (Catálogo # 20000, Stem Cell) y el programa "Human NK Negative Selection 19055 and high recovery" (50 μ l/ml de adición de cóctel, 100 μ l/ml de adición de micropartículas, incubaciones de 10 y 5 minutos, separaciones a 1x 2,5 minutos) con Human NK Cell Enrichment Kit (Catálogo #19055, Stem Cell) incluyendo EasySep Negative Selection Human NK Cell Enrichment Cocktail y EasySep Magnetic Micropartículas. Una población de CD56⁺CD3⁻ se recolectó así y estaba lista para análisis adicional.

Expansión de Células asesinas naturales. En general, las células asesinas naturales se expandieron de la siguiente manera. Se preparó Medio de Inicio para el cultivo de células asesinas naturales en base a una modificación de un protocolo descrito en Yssel et al., J. Immunol. Methods 72(1):219-227 (1984) y Litwin et al, J. Exp. Med. 178(4):1321-1326 (1993). En síntesis, Medio de Inicio incluye IMDM (Invitrogen) con 10% FCS (Hyclone), que contiene los siguientes reactivos con concentración final de 35 μ g/ml de transferrina (Sigma- Aldrich), 5 μ g/ml de insulina (Sigma- Aldrich), 2 x 10^{-5} M de etanolamina (Sigma- Aldrich), 1 μ g/ml de ácido oleico (Sigma- Aldrich), 1 μ g/ml de ácido linoleico (Sigma- Aldrich), 0,2 μ g/ml de ácido palmítico (Sigma- Aldrich), 2,5 μ g/ml de BSA (Sigma- Aldrich) y 0,1 μ g/ml de Fitohemaglutinina (PHA-P, Sigma- Aldrich). Las células NK CD56⁺CD3⁻ se volvieron a suspender en 2,5 x 10^5 células vivas/ml Medio de Inicio más 200 IU/ml IL-2 (R&D Systems) en placa de 24 pocillos tratados con cultivo celular o matraz T. Se agregaron ambos PBMC alogénico tratado con Mitomicina C y células K562 (línea celular de leucemia mielógena crónica) se agregaron al Medio de Inicio como células de alimentación, a una concentración final de 1 x 10^6 por ml. Las células NK se cultivaron durante 5-6 días a 37°C en 5% CO₂. Después de 5-6 días y luego cada 3-4 días un volumen igual de Medio de Mantenimiento (IMDM con 10% FCS, 2% suero Humano AB, antibióticos, L- glutamina y 400 unidades de IL-2 por ml) se agregó al cultivo. Las células NK se cosecharon el día 21.

La caracterización de Células asesinas naturales intermedias derivadas de la placenta. El HPP y el CB coincidentes donantes se descongelaron, y las células se lavaron con buffer FACS (RPMI- 1640 con 5% FBS). Las células asesinas naturales luego se enriquecieron con microperlas de CD56 mediante la utilización del sistema de separación magnética ROBOSEP® (StemCell Technologies) según las instrucciones del fabricante. La población de células asesinas naturales enriquecidas CD56 se tiñó los siguientes anticuerpos (BD Bioscience si no se indica de otro modo) para caracterización inmunofenotípica: anti-CD56 conjugado a PE-Cy-7, anti-CD3 APC Cy7, anti-CD16 FITC, anti-NKG2D APC, anti-NKp46 APC, anti-CD94 PE(R&D), anti-NKBI PE₅ y anti-KIR- NKAT2 PE. CD94, NKG2D y NKp46 son marcadores presentes, o que muestran expresión reducida, en los progenitores de células NK pero está presente sobre células NK totalmente diferenciadas. Véase Freud et al., "Evidence for Discrete States of Human

5 Natural Killer Cell Differentiation In Vivo," J. Exp. Med. 203(4): 1033- 1043 (2006); Eagle & Trowsdale, "Promiscuity and the Single Receptor: NKG2D," Nature Reviews Immunology Published online August 3, 2007; Walzer et al., "Natural Killer Cells: From CD3NKp46⁺ to Post-Genomics Meta-Analyses," Curr. Opin Immunol. 19:365-372 (2007). Como se muestra en la Tabla 1, expresión de KIR3DL1, KIR2DL2/L3, NKG2D, NKp46 y CD94 no fue significativamente diferente entre una población celular CD56⁺ enriquecida de HPP y una célula CD56⁺ coincidente con HLA de la sangre del cordón umbilical (CB).

Tabla 1. Porcentaje de las células NK que llevan ciertas combinaciones de marcadores. Promedio de 3 muestras.

	Promedio (%)		Valor p
	CB	HPP	
CD3-CD56+	0,6	0,7	0,799
CD3-CD56+CD16-	53,9	58,7	0,544
CD3-CD56+CD16+	46,1	41,3	0,544
CD3-CD56+KIR3DL1+	5,8	7,3	0,762
CD3-CD56+KIR2DL2/L3+	10,7	9,9	0,89
CD3-CD56+NKG2D+	60,3	58,5	0,865
CD3-CD56+CD94+	74,6	76,8	0,839

10 6.2. Ejemplo 2: Caracterización de células asesinas naturales intermedias derivadas de la placenta de perfusato placentario y sangre del cordón umbilical combinados

Las células mono nucleadas donantes equivalente de la sangre del cordón umbilical y el perfusato placentario (combo) se mezclaron y se lavaron con buffer FACS (RPMI- 1640 con 5% FBS) una vez y se caracterizaron inmunofenotípicamente mediante la utilización de los anticuerpos enumeradas en la Tabla 2 en un BD FACSCanto (BD Biosciences). Los datos se caracterizaron por el software FlowJo (Tree Star).

15 Tabla 2: Lista de anticuerpos usados en la caracterización inmunofenotípica.

Artículo	Proveedor	Número de catálogo
FITC anti-hu CD3	BD Bioscience	555332
FITC anti-hu CD3	Miltenyi	130-080-401
APC-Cy7 anti-hu CD3	BD Bioscience	557832
FITC anti-hu CD16	BD Bioscience	555406
PE-Cy5 anti-hu CD16	BD Bioscience	555408
PE anti-hu CD56	BD Bioscience	555516
PE anti-hu CD56	Miltenyi	130-090-755
PE-CY5 anti-hu CD56	BD Bioscience	555517
PE-Cy7 anti-hu CD56	BD Bioscience	557747
PE anti-hu CD94	R&D	FAB-1058P
PE anti-hu KIR-NKAT2 (2DL/L3)	BD Bioscience	556071
PE anti-hu NKB1 (3DL1)	BD Bioscience	555967
APC anti-hu NKG2D	BD Bioscience	558071
APC anti-hu NKp46	BD Bioscience	558051
PE anti-hu CD226	BD Bioscience	559789
PE anti-hu NKp44	BD Bioscience	558563
PE anti-hu NKp30	BD Bioscience	558407
PE anti-hu 2B4	BD Bioscience	550816
Isotipo FITC IgG1 de ratón	BD Bioscience	340755
Isotipo FITC IgG2b de ratón	BD Bioscience	556577
Isotipo PE IgG1 de ratón	BD Bioscience	340761
Isotipo PE IgG2b de ratón	BD Bioscience	555743
Isotipo PerCP IgG1 de ratón	BD Bioscience	340762
Isotipo PE-Cy5 IgG2b de ratón	BD Bioscience	555744
Isotipo APC IgG1 de ratón	BD Bioscience	340754
Isotipo APC IgG2a de ratón	BD Bioscience	555576
Isotipo APC-Cy7 IgG1 de ratón	BD Bioscience	348802
Isotipo PE-Cy7 IgG1 de ratón	BD Bioscience	348798

20 *Caracterización inmunofenotípica de células NK placentarias y células NK de sangre periférica (PB).* Las células NK pueden dividirse en dos grupos principales: células NK CD56⁺CD16⁺, y células CD56⁺CD16⁻. Las células NK CD56⁺CD16⁺ tienen gránulos citotóxicos abundantes y elevada expresión de CD16, y por lo tanto son capaces de generar citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo (ADCC). Las células NK CD56⁺CD16⁻, por el

contrario, tienen muy pocos gránulos citolíticos, baja o ninguna expresión de CD 16, pero son capaces de producir citoquinas y quimiocinas tras la activación. Las células NK individuales muestran un repertorio diverso de receptores de activación e inhibición, incluyendo los receptores similares a la inmunoglobulina asesina (KIRs, p. ej., KIR3DL1, y KIR2DL2/3), NCRs receptores de citotoxicidad natural (p. ej., NKp30, NKp44, y NKp46), receptores con aspecto de lectina de células asesinas (KLRs; p. ej., CD94, NKG2D), 2B4 y CD226.

El análisis por FACS se realizó sobre las células NK placentarias y células NK de sangre periférica mediante la utilización de mAbs conjugados con fluorescencia contra los receptores NK específicos. Entre los 11 sub-grupos de NK, las cantidades de las células presentes en siete de 11 sub-grupos NK (CD3⁺CD56⁺CD16⁻, CD3⁺CD56⁺CD16⁺, CD3⁺CD56⁺KIR2DL2/3⁺, CD3⁺CD56⁺NKp46⁺, CD3⁺CD56⁺NKp30⁺, CD3⁺CD56⁺2B4⁺ y CD3⁺CD56⁺CD94⁺) mostraron diferencia significativa (p < 0,05) entre sangre NK placentaria y las células NK de sangre periférica (explicaron 64% de diferencia) (Tabla 3 A; véase además Tablas 3B y 3C).

Tabla 3 A. La caracterización fenotípica de las células NK CD3⁺CD56⁺ en 16 unidades de la sangre del cordón umbilical coincidente y perfusato placentario humano de donante combinadas (combo) y 13 unidades de sangre periférica (PB). El análisis t de dos muestras se usa para determinar si los promedios de la población son iguales en unidades de sangre placentaria y periférica.

Marcadores de superficie	Combo (16 unidades) Porcentaje promedio (%)	PB (13 unidades) Porcentaje promedio (%)	Valor p
CD3-CD56+	2,2	2,4	0,728
CD3-CD56+CD16-	60,9	21,4	0,000
CD3-CD56+CD16+	39,1	78,6	0,000
CD3-CD56+KIR3DL1	12,3	7,1	0,099
CD3-CD56+KIR2DL2/L3	21,9	9,5	0,004
CD3-CD56+NKG2D	42,1	29,9	0,126
CD3-CD56+NKp46	7,0	18,9	0,011
CD3-CD56+CD226	16,0	26,7	0,135
CD3-CD56+NKp44	9,5	4,9	0,073
CD3-CD56+NKp30	39,1	19,0	0,006
CD3-CD56+2B4	11,1	4,5	0,019
CD3-CD56+CD94	71,3	26,2	0,000

Las Tablas 3B y 3C muestran la caracterización fenotípica de células NK CD3⁺CD56⁺CD16⁻ y CD3⁺CD56⁺CD16⁺ en 16 unidades de la sangre del cordón umbilical coincidente y perfusato placentario humano de donante combinadas (combo) y 13 unidades de sangre periférica (PB) en un experimento separado.

Tabla 3B.

Marcadores de superficie	Combo Porcentaje promedio (%)	PB Porcentaje promedio (%)	Valor p
CD3-CD56+CD16-	62,3	14,1	0,000
CD3-CD56+CD16-KIR3DL1	7,8	1,5	0,004
CD3-CD56+CD16-NKG2D	43,5	42,7	0,091
CD3-CD56+CD16-KIR2DL2/L3	13,6	2,4	0,000
CD3-CD56+CD16-NKp46	6,7	43,6	0,001
CD3-CD56+CD16-CD94	69,8	48,5	0,057
CD3-CD56+CD16-CD226	7,6	4,9	0,068
CD3-CD56+CD16-NKp44	3,4	0,6	0,076
CD3-CD56+CD16-NKp30	46,7	22,0	0,000
CD3-CD56+CD16-2B4	3,7	0,5	0,078

Tabla 3C.

Marcadores de superficie	Combo Porcentaje promedio (%)	PB Porcentaje promedio (%)	Valor p
CD3-CD56+CD16+	37,7	85,9	0,000
CD3-CD56+CD16+KIR3DL1	21,5	8,9	0,014
CD3-CD56+CD16+NKG2D	42,1	28,5	0,066
CD3-CD56+CD16+KIR2DL2/L3	34,5	12,1	0,000
CD3-CD56+CD16+NKp46	10,4	14,5	0,242
CD3-CD56+CD16+CD94	72,9	23,8	0,000
CD3-CD56+CD16+CD226	35,5	32,6	0,347
CD3-CD56+CD16+NKp44	22,6	6,4	0,016
CD3-CD56+CD16+NKp30	45,7	19,7	0,000
CD3-CD56+CD16+2B4	31,2	6,1	0,008

5 Un 60,9% de las células NK placentarias son CD56⁺CD16⁻ (células asesinas naturales intermedias derivadas de placenta (PINK)) mientras que únicamente 21,4% de las células NK de sangre periférica son CD56⁺CD16⁻. Después del cultivo durante 21 días, el porcentaje de cuatro de 11 subgrupos de NK (CD3⁺CD56⁺KIR2DL2/3⁺, CD3⁺CD56⁺NKp46⁺, CD3⁺CD56⁻NKp44⁺ y CD3⁺CD56⁻NKp30⁺) mostraron diferencia significativa (p < 0,05) entre las células NK placentarias y de sangre periférica (Tabla 4).

10 Tabla 4. Caracterización fenotípica de las células NK cultivadas durante 21 días derivadas de 12 unidades de la sangre del cordón umbilical coincidente y perfusato placentario humano de donante combinadas (Combo), y 9 unidades de sangre periférica (PB). El análisis t de dos muestras se usa para determinar si los promedios de la población son iguales en las unidades del combo y la sangre periférica.

Marcadores de superficie	Combo (16 unidades) Porcentaje promedio (%)	PB (13 unidades) Porcentaje promedio (%)	Valor p
CD3-CD56+	2,2	2,4	0,728
CD3-CD56+CD16-	60,9	21,4	0,000
CD3-CD56+CD16+	39,1	78,6	0,000
CD3-CD56+KIR3DL1	12,3	7,1	0,099
CD3-CD56+KIR2DL2/L3	21,9	9,5	0,004
CD3-CD56+NKG2D	42,1	29,9	0,126
CD3-CD56+NKp46	7,0	18,9	0,011
CD3-CD56+CD226	16,0	26,7	0,135
CD3-CD56+NKp44	9,5	4,9	0,073
CD3-CD56+NKp30	39,1	19,0	0,006
CD3-CD56+2B4	11,1	4,5	0,019
CD3-CD56+CD94	71,3	26,2	0,000

15 Además, en un experimento separado, se determinó que, después del cultivo durante 21 días, las células NK placentarias y de sangre periférica demostraron perfiles de citoquinas únicas, en particular para IL-8, según se determina mediante ensayo Luminex (Tabla 5).

Tabla 5

Citoquina	PB (pg/ml)	Combo (pg/ml)
IL-13	1,26	1,89
IL-8	6,61	15,77
IL-10	1,26	2,23
TNFa	0,28	0,34
MCP/1	10,49	11,32

20 *Perfilación por MicroRNA de las células NK de placenta y células NK de sangre periférica.* Las células NK aisladas y expandidas se someten a preparación por microRNA (miRNA) mediante la utilización de un Kit MIRV ANA™ miRNA Isolation Kit (Ambion, Cat# 1560). Las células NK (0,5 a 1,5 x 10⁶ células) se alteraron en un buffer de lisis desnaturalizante. Luego, se someten las muestras a una extracción de ácido-fenol+cloromo para aislar ARN altamente enriquecidos para pequeñas especies de ARN. Se agregó 100% de etanol para llevar las muestras a 25% de etanol. Cuando esta mezcla de lisato/etanol se pasó a través de un filtro de fibra de vidrio, ARNs extensos se inmovilizaron, y las pequeñas especies de ARN se recolectaron en el filtrado. La concentración de etanol del filtrado
25 luego se aumentó hasta 55%, y la mezcla se pasó a través de un segundo filtro de fibra de vidrio donde los

pequeños ARNs se inmovilizaron. Este ARN se lavó algunas veces, y se eluyó en una solución de baja potencia iónica. La concentración y la pureza del ARN pequeño recuperado se determinaron por medición de su absorbancia 260 y 280 nm.

5 Se encontró que los miRNAs eran únicos para las células PINK se muestran en la Tabla 6. Un miRNA, designado hsa-miR-199b, se encontró que era único para las células NK de sangre periférica. Tabla 6. Perfilación de miRNA para las células PINK y las células NK PB por medio de qRT-PCR.

Identificación de miRNA	Nro. de acceso a Sanger	Secuencia
hsa-miR-100	MIMAT0000098	aaccgguagaucggaacuugug
hsa-miR-127	MIMAT0000446	ucggauccgucugagcuuggcu
hsa-miR-211	MIMAT0000268	uucccuuugucauccuucgccu
hsa-miR-302c	MIMAT0000717	uaagugcuuccauguuucagugg
hsa-miR-326	MIMAT0000756	ccucuggggccuuccuccag
hsa-miR-337	MIMAT0000754	uccagcuccuauaugaugccuuu
hsa-miR-497	MIMAT0002820	cagcagcacacugugguuugu
hsa-miR-512-3p	MIMAT0002823	aagugcugucauagcugagguc
hsa-miR-515-5p	MIMAT0002826	uucuccaaaagaaagcacuuucug
hsa-miR-517b	MIMAT0002857	ucgugcauccuuuagaguguu
hsa-miR-517c	MIMAT0002866	aucgugcauccuuuagagugu
hsa-miR-518a	MIMAT0002863	aaagcgcuuccuuugcugga
hsa-miR-518e	MIMAT0002861	aaagcgcuuccuuucagagug
hsa-miR-519d	MIMAT0002853	caaagugccuccuuuagagug
hsa-miR-520g	MIMAT0002858	acaagugcuuccuuuagagugu
hsa-miR-520h	MIMAT0002867	acaagugcuuccuuuagagu
hsa-miR-564	MIMAT0003228	aggcacggugucagcaggc
hsa-miR-566	MIMAT0003230	gggcccugugaucccaac
hsa-miR-618	MIMAT0003287	aaacucuacuuguccuucugagu
hsa-miR-99a	MIMAT0000097	aaccgguagaucggaucuugug

10 *Caracterización Immunofenotípica de Células NK placentarias cultivadas y Células NK no cultivadas.* Las propiedades generales de las células PINK cultivadas se evaluaron mediante estudios inmunofenotípicos extensivos y ensayos de citotoxicidad. Para determinar el fenotipo de las células NK expandidas, la expresión de los receptores NK (NKR) tales como KIRs, NKG2D, NKp46, NKp44 y 2B4 se analizaron. Se realizaron ensayos de citotoxicidad por rotulado de las células tumorales (células K562) con PKH26 luego se co-cultivan con las células PINK durante 4 horas. Desde el día 0 hasta el día 21 la expresión de NKG2D se aumentó desde 60,9% ± 4,8% hasta 86% ± 17,4% (valor p de 0,024); NKp46 se aumentó desde 10,5% ± 5,4% hasta 82,8% ± 9,0% (valor p de 0,00002); NKp44 se aumentó desde 9,6% ± 6,5% to 51,6% ± 27,5% (valor p de 0,022); y 2B4 se disminuyó desde 13,0% ± 7,1% hasta 0,65% ± 0,5% (valor p de 0,009%) (Tabla 7). En estas condiciones de cultivo en los KIRs inhibidores incluyendo KIR3DL1 (receptor símil inmunoglobulina de células asesinas, tres dominios, cola 1 citoplasmática larga, un receptor inhibidor) y KIR2DL2/L3 (receptor símil inmunoglobulina de células asesinas, dos dominios, cola 2 citoplasmática larga y cola 3 citoplasmática larga; receptores inhibidores) no se vieron afectadas durante la expansión durante 21 días. Los cambios en los NKR de expresión se correlacionaron en forma adicional con un aumento marcado en la actividad citolítica el día 21 versus el día 14 contra las células K562 (63% ± 15% versus 45% ± 4%, valor p de 0,0004). Estos hallazgos han conducido a la identificación de los marcadores putativos de las células NK que se correlacionan bien con la actividad de citotoxicidad de células NK.

Tabla 7. Caracterización fenotípica de las células PINK antes y después del cultivo de 21 días. La desviación estándar (Desv. est.) se calculó para los promedios de la población para 5 donantes.

	Día 0		Día 21	
	Porcentaje promedio (%)	Desv. Est.	Porcentaje promedio (%)	Desv. Est.
CD3-CD56+	2,9	1,1	85,5	8,6
CD3-CD56+CD16-	62,6	20,2	27,8	8,3
CD3-CD56+CD16+	37,4	20,2	72,2	8,3
CD3-CD56+KIR3DL1+	22,7	4,2	20,0	16,7
CD3-CD56+KIR2DL2/L3+	28,4	4,2	29,6	6,4
CD3-CD56+NKG2D+	60,9	4,8	86,0	17,4
CD3-CD56+NKp46+	10,5	5,4	82,8	8,9
CD3-CD56+CD226+	19,5	7,4	14,1	13,3
CD3-CD56+NKp44+	9,6	6,5	51,6	27,5
CD3-CD56+NKp30+	58,9	7,0	76,5	19,4
CD3-CD56+2B4+	13,0	7,1	0,6	0,5
CD3-CD56+CD94+	79,7	4,9	63,9	19,4

5 *Perfilación proteómica de membrana de las Células NK placentarias cultivadas y Células NK cultivadas de sangre periférica por medio de inmovilización de proteínas basadas en lípidos y trampa iónica lineal LC/MS.*

10 Purificación de las proteína de membrana: Las células asesinas naturales de la placenta de perfusato placentario y células de sangre periférica combinados, y las células NK PB, cultivadas durante 21 días, se incubaron durante 15 min con una solución de cóctel inhibidor de proteasa (P8340, Sigma Aldrich, St. Louis, MO; contiene fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencensulfonilo (AEBSF), pepstatina A, E- 64, bestatina, leupeptina, y aprotinina, sin quelador(es) metálicos antes de la lisis celular. Las células luego se lisaron mediante la incorporación de una solución de HCl 10 mM, sin detergentes, y se centrifugó durante 10 min a 400 g para formar escamas y eliminar los núcleos. El sobrenadante post-nuclear se transfirió a un tubo de ultracentrifugación y se centrifugó en un ultracentrífugo WX80 con rotor T- 1270 (Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC) a 100.000 g durante 150 minutos generando una escama de proteínas de la membrana.

20 Generación, inmovilización y digestión de Proteoliposomas: La escama de proteínas de la membrana se lavó varias veces mediante la utilización de buffer NANOXIS® (10 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8). La escama de proteínas de la membrana se suspendió en 1,5 ml de buffer NANOXIS® y luego se sonicó la punta mediante la utilización de un procesador ultrasónico VIBRA-CELL™ VC505 (Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT) durante 20 minutos sobre hielo. El tamaño de los proteoliposomas se determinó por pigmentación con pigmento FM 1-43 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y visualización con microscopio por fluorescencia. La concentración de proteínas de la suspensión de proteoliposomas se determinó por un ensayo BCA (Thermo Scientific). Los proteoliposomas luego se inyectaron sobre un LPI™ Flow Cell (Nanoxis AB, Gothenburg, Suecia) mediante la utilización de una punta de pipeta estándar y se dejó inmovilizar durante 1 hora. Después de la inmovilización, una serie de etapas de lavado se llevaron a cabo y tripsina at 5 µg/ml (Princeton Separations, Adelphi, NJ) se inyectó directamente sobre la LPI™ Flow Cell. The se incubó el congelado hasta la mañana siguiente a 37°C. Luego se eluyeron los péptidos trípticos del congelado y se eliminó la sal mediante la utilización de un cartucho Sep-Pak (Waters Corporation, Milford, MA).

30 Fraccionamiento por intercambio de cationes fuertes (SCX): Los péptidos trípticos se reconstituyeron en una solución al 0,1% de ácido fórmico /agua y se cargaron en una columna de intercambio de cationes fuerte (SCX) TOP- TIP™ (PoliIC, Columbia, MD), una punta de pipeta empacada con 30 µm de material de empaque polisulfonil aspartamida SCX. Los péptidos se eluyeron del SCX TOP-TIP™ mediante la utilización de un gradiente en etapas de buffer de formiato de amonio, pH 2,8 (10 mM-500 mM). Cada fracción de SCX se secó mediante la utilización de un sistema speed-vac y se reconstituyó con 5% acetonitrilo, 0,1% Ácido fórmico en la preparación para análisis de LC/MC corriente abajo.

35 Análisis LC/MS/MS por trampa de iones lineales LTQ: Cada fracción de SCX se separó en una columna 0,2 mm x 150 mm 3µm 200 A MAGIC CI 8 (Michrom Biosources, Inc., Auburn, CA) que se conectó en interfaz directamente a una fuente de ionización por electro aspersion de nano capilares asistida al vacío por desolvación axial (ADVANCE) (Michrom Biosources, Inc.) mediante la utilización de un gradiente de 180 min (Buffer A: Agua, 0,1% Ácido fórmico; Buffer B: Acetonitrilo, 0,1% Ácido fórmico). La fuente ADVANCE logra una sensibilidad que es comparable con el nanoESI tradicional mientras se opera a un caudal de flujo considerablemente más alto de 3 µl/min. Los péptidos eluidos se analizaron en un espectrómetro de masa con trampa de iones lineal LTQ (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) que empleó diez barridos por MS/MS dependientes de los datos luego de cada espectro de masa con barrido completo.

Bioinformática: Se realizó una búsqueda en seis archivos sin procesar correspondientes a las 6 fracciones de sal que se recolectaron para cada línea celular de tumor (AML, CML) como una búsqueda simple contra la Base de datos Humana IPI mediante la utilización de una implementación del algoritmo SEQUEST en una estación de trabajo SORCERER™ SOLO™ (Sage-N Research, San Jose, CA). Se especificó una tolerancia de masa de péptido de 1,2 amu, se especificó la oxidación de la metionina como una modificación diferencial, y carbamidometilación se especificó como una modificación estática. Una implementación del software por armazón proteico del Trans-Proteomic Pipeline (TPP) se usó para clasificar y analizar los datos proteómicos de la membrana. Se consideraron las proteínas para análisis si se identificaron con una probabilidad de péptido de 95%, probabilidad de proteínas de 95% y 1 péptido único. Se realizaron comparaciones entre las bases de datos de membrana proteómica se realizaron mediante la utilización de secuencias de comandos Perl personalizados que se desarrollaron internamente.

Los análisis revelaron la identificación de 8 proteínas de la membrana de células NK placentarias cultivadas que fueron únicas con respecto a las proteínas de la membrana identificadas de las células NK de sangre periférica. Véase la Tabla 8. Además, 8 se identificaron las proteínas de la membrana de las células NK de sangre periférica que fueron únicas con respecto a las células NK placentarias cultivadas. Véase la Tabla 8. Únicamente se encontró que 10 proteínas de la membrana identificadas compartían ambas células NK placentarias cultivadas y las células NK de sangre periférica. Tabla 8.

PROTEÍNAS ESPECÍFICAS PARA CÉLULAS DE LA PLACENTA NK	PROTEÍNAS ESPECÍFICAS PARA CÉLULAS NK PB
Aminopeptidasa N	Precursor 4 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
Apolipoproteína E	Inmunidad de nucleótidos asociados 4- como la proteína 1
Interacción de proteínas 1 de atrofina 1	Precursor de integrina alfa-L
Inexina inx-3	Precursor de integrina beta-2
Precursor de integrina alfa-2	Precursor de integrina beta-4
Precursor de integrina beta-5	Precursor D de transglicosilasa de mureína de lítica unida a la membrana
Precursor GP49B glicoproteína de superficie de mastocitos	Proteína relacionada a proteína de unión de oxisterol 8
Receptor de Rianodina 1	Precursor de perforina 1

6.3. Ejemplo 3 : Citotoxicidad de las células asesinas naturales hacia las células tumorales

Este ejemplo demuestra que las células asesinas naturales placentarias intermedias son citotóxicas hacia las células tumorales. Las células PINK de HPP son citotóxicas para las células de leucemia mielógeno agudo, según se demostró en un ensayo de citotoxicidad y por análisis con Luminex de secreción de citoquinas de células NK.

En el ensayo de secreción de citoquinas, Las células NK de HPP enriquecidas por microperlas CD56 se mezclaron con células de leucemia mielógeno agudo KG-1a a una proporción 1:1. Después de la incubación durante 24 horas, sobrenadante se recolectó y se sometió a análisis Luminex de la secreción IFN- γ y GM-CSF. Se observaron niveles aumentados de IFN- γ y GM-CSF después de la incubación durante 24h de células HPP enriquecidas con CD56 con las células KG-1a como se muestra en la FIG. 2.

Citotoxicidad de las células PINK

En un ensayo de citotoxicidad que utiliza las células PINK, las células tumorales de destino se marcaron con éster de succinimidil carboxifluorosceína (CFSE). CFSE es un pigmento vital que no es tóxico para las células, y se particiona entre las células hijas durante la división celular. Las células se colocaron luego en las placas de cultivo con base U de 96 pocillos y se incubó con las células PINK CD56⁺CD16⁻ recién aisladas en proporciones de blanco-efector (E:T) ratios de 20:1, 10:1, 5:1 y 1:1 en RPMI 1640 adicionado con 10% FBS. Después de un tiempo de incubación de 4 horas, células se cosecharon y se examinaron mediante citometría de flujo para determinar la presencia de CFSE. La cantidad de células blanco recuperadas de cultivo sin las células NK se usó como una referencia. La citotoxicidad se define como: $(1 - CFSE_{muestra}/CFSE_{control}) * 100\%$. La toxicidad de células tumorales significativas se observó a la proporción de 20:1. Véase la FIG. 3.

Susceptibilidad de las células tumorales por células PINK cultivadas

Ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH). El ensayo de liberación de LDH se realizó mediante la utilización del kit de citotoxicidad colorimétrica CITOTOX 96® (Promega, Cat# GI 780). En este ensayo, las células NK cultivadas, que comprende una combinación de células CD56⁺CD16⁻ y CD56⁺CD16⁺ derivadas de HPPAJCB coincidentes, fueron las células efectoras, y las células tumorales fueron células diana. Se colocaron células diana y células efectoras en placas de cultivo de tejidos con base U de 96 pocillos y se incubó en varias proporciones

efector-diana (E:T) en 100 µl RPMI 1640 sin rojo fenol (Invitrogen, Cat# 11835-030) adicionado con 2% suero AB humano (Gemini, Cat# 100- 512). Se incubaron los cultivos durante 4h a 37°C en 5% CO₂. Después de la incubación, 50 µl sobrenadante se transfirió una placa de ensayo enzimática, la actividad de LDH se detectó según se proporcionó con el fabricante, y la absorción se midió a 490 nm en un lector ELISA (Synergy HT, Biotek). El grado de citotoxicidad se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación: % de Citotoxicidad = (Muestra - Efector espontáneo - Diana espontánea)/(Diana máxima - Diana espontánea)* 100.

Ciertos tipos de tumor pueden ser sensibles a las células NK que otros. Para analizar la susceptibilidad de las células tumorales por las células PINK cultivadas, doce líneas celulares de tumores diferentes, co-cultivadas con las células PINK, se analizaron en un ensayo de liberación de LDH. The 12 líneas celulares de tumor incluyeron leucemia mielógena crónica aguda (CML), linfoma, retinoblastoma (RB), y mieloma múltiple (MM) (Tabla 9). La citotoxicidad de las células NK se midió por el ensayo de liberación de LDH después de co-cultivo de 4 horas.

Tabla 9. ATCC Líneas celulares de tumor

Nombre	Descripción
CCRF-CEM	Leucemia humana
KG-1	Leucemia mieloide aguda humana
KG-1A	Leucemia mieloide aguda humana
K562	Leucemia mieloide crónica humana
KU812	Leucemia mieloide crónica humana
U-937	Linfoma histiocítico humano
WERI-RB-1	Retinoblastoma humano
HCC2218	Cáncer de mama humano
RPMI 8226	Mieloma múltiple humana
HCT116	Carcinoma color rectal humano
HT29	Adenocarcinoma color rectal humano
U266	Mieloma múltiple humana

A la proporción de efector a diana (E:T) de 10:1 citotoxicidad significativa de las células PINK cultivadas se observó hacia las células K562 (CML) a 88,6% ± 5,6%, células U937 (linfoma) a 89,2% ± 9,8%, células WERI-RB-1 (RB) a 73,3% ± 11,8%, células RPMI8226 (MM) a 61,3% ± 1,3%, y células U266 (MM) a 57,4% ± 4,7% (Tabla 10).

Tabla 10. Susceptibilidad diferencial de células tumorales por las células PINK cultivadas. El error estándar del promedio (S. E. M.) se calculó para el promedio citotoxicidad de 3 donantes.

Línea celular	% Citotoxicidad	S.E.M
CCRF-CEM	7,6	1,2
KG-1	20,5	1,5
KG-1a	6,0	3,2
K562	88,6	5,6
KU812	40,3	8,2
U937	89,2	9,8
WERI-RB-1	73,3	11,8
RPMI8226	61,3	1,3
U266	57,4	4,7
HCT-116	61,0	5,1
HCC2218	14,8	3,7
HT-29	45,6	6,0

20 *Potenciación de la citotoxicidad de las células PINK por tratamiento con Lenalidomida y Pomalidomida*

Aislamiento y purificación de ARN. Las células NK aisladas y expandidas se someten a preparación del ARN mediante la utilización del Kit RNAQUEOUS®-4PCR (Ambion, Cat #AM1914). En síntesis, las células NK (0,5 a 1,5 x 10⁶ células) se lisaron en la solución de lisis de guanidinio. El lisato muestra luego se mezcló con una solución de etanol, y se aplicó a un filtro con base de sílice que se une selectivamente y cuantitativamente se une al mRNA y los ARNs ribosómicos más grandes; los ARNs muy pequeños tales como tRNA y ARN 5S ribosómico no se unieron cuantitativamente. Luego el filtro se lavó para retirar el ADN residual, proteína, y otros contaminantes, y el ARN se eluyó en agua libre de nucleasa que contiene una cantidad en trazas de EDTA para quelar metales pesados. El filtro de sílice se albergó en un pequeño cartucho que se adapta en los tubos micrófugos libres de RNasa provistos con el kit. Las muestras de lisato, las soluciones de lavado, y la solución de elución se movieron a través del filtro por centrifugado o presión al vacío. Después de la elución del ARN del filtro se trató con la DNasa 1 ultra pura proporcionada con el kit para retirar las cantidades en trazas de ADN. Finalmente, la DNasa y los cationes divalentes

se eliminaron mediante un reactivo también proporcionado con el kit. La concentración y la pureza del ARN recuperado se determinaron por medición de su absorbancia 260 y 280 nm.

5 *Análisis cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR).* El ARN aislado luego puede usar en la síntesis de cADN mediante la utilización de los Reactivos de Transcripción Inversa TAQMAN® (Applied Biosystems, Cat #N8080234) seguido del análisis por PCR en tiempo real por el Sistema por PCR en Tiempo Real Rápido 7900HT mediante la utilización de Human Immune Array (Applied Biosystems, Cat# 4370573) y Human MicroRNA Array (Applied Biosystems, Cat# 4384792).

10 La lenalidomida y la pomalidomida son análogos químicos de talidomida con actividades potenciadas contra el cáncer y antiinflamatorias. Para estudiar si la lenalidomida y la pomalidomida podrían potenciar la citotoxicidad de las células PINK, cultivadas ex vivo (día 19) células PESfK se pre-trataron con lenalidomida o pomalidomida durante 24 horas seguido del co-cultivo con línea celular de carcinoma colo-rectal HCT-1 16. Las células NK tratadas con lenalidomida demostraron un 42,1% de citotoxicidad y las células NK tratadas con pomalidomida 47,4% de citotoxicidad, mientras que el control de células PINK no tratadas mostró únicamente 24,3% de citotoxicidad.

15 Los análisis por PCR en tiempo real PCR (qRT-PCR) y citometría de flujo mostraron que la potenciación generada por pomalidomida de la toxicidad de células NK se correlacionó con aumento de la expresión de los genes de granzima B (GZMB) (60% ± 1,7% de aumento) (Tabla 11) y aumento en el porcentaje de las células NK GZMB positivo (25% de aumento). Además, la expresión de GM-CSF se aumentó en las células PINK tratadas con lenalidomida (232% ± 1,6% de aumento) y pomalidomida (396% ± 0,3% de aumento) (Tabla 1 1A, 1 IB).

20 Tabla 11A, 11B. Análisis por qRT-PCT de las células PINK cultivadas de lenalidomida y pomalidomida comparado con células no tratadas. 11A: Cambio en veces de la expresión génica entre células tratadas con lenalidomida y no tratadas con lenalinomida para los genes enumerados. El análisis t en pares se usa para determinar si cambio en veces son iguales en las muestras tratadas y no tratadas con lenalindomida. 11B: Cambio en veces de la expresión génica entre muestras de células tratadas con pomalidomida y no tratadas con pomalidomida para 25 genes enumerados. El análisis t en pares se usa para determinar si los cambios en veces son iguales en muestras tratadas y no tratadas.

Tabla 11A

	Veh	Len.	Desv. Est. De Veh	Desv. Est. De Len.	Valor p
BAX	1	1,39	0,06	0,02	0,05
CCL5	1	1,24	0,11	0,07	0,04
CCR5	1	0,9	0,07	0,08	0,02
CD68	1	4,04	0,05	0,13	0,01
CD8A	1	1,3	0,01	0,02	0,02
CSF2	1	2,32	0,14	0,02	0,02
FAS	1	1,11	0,02	0,04	0,04
GUSB	1	1,13	0,04	0,07	0,05
IL2RA	1	1,26	0,03	0,01	0,03
TNFRSF18	1	0,7	0,1	0,16	0,04

BAX – proteína X asociada con BCL2

CCL5 – ligando de quimiocina (motivo C-C) 5

30 CCR5 – receptor de quimiocina (motivo C-C) 5

CSF2 - factor estimulante de colonia 2 (macrófago-granulocito)

FAS – súper familia del receptor de TNF, miembro 6

GUSB - β glucuronidasa β

IL2RA – receptor α de interleucina 2

35 TNFRSF 18 – súper familia del receptor del factor de necrosis tumoral 18

Tabla 11B

	Veh	Pom.	Desv. Est. De Veh	Desv. Est. De Pom.	Valor p
ACTB	1	0,77	0,01	0	0,01
BAX	1	2,23	0,06	0	0,01
CCL2	1	5,46	0,01	0,37	0,02
CCL3	1	2,2	0,04	0,16	0,02
CCL5	1	1,78	0,11	0,04	0,02
CCR5	1	0,68	0,7	0	0,05
CD68	1	8,74	0,05	0,19	0
CD80	1	1,59	0,13	0,19	0,02
CD8A	1	2,39	0,01	0,08	0,01
CSF1	1	1,41	0,7	0,05	0,01
CSF2	1	3,96	0,14	0	0,01
ECE1	1	1,56	0,06	0,12	0,02
FAS	1	1,34	0,02	0,03	0,01
GNLY	1,01	1,96	0,18	0,02	0,05
GUSB	1	1,76	0,04	0,01	0,01
GZMB	1	1,59	0,06	0,02	0,03
IL10	1,02	1,52	0,31	0,22	0,04
IL1A	1,01	2,61	0,19	0,12	0,01
IL2RA	1	1,58	0,03	0,06	0,01
IL8	1	1,62	0,04	0,06	0,04
LTA	1	2,88	0,02	0,21	0,02
PRF1	1	1,17	0,7	0,1	0,05
PTGS2	1	1,68	0,01	0,05	0,02
SKI	1	1,96	0,04	0,02	0,01
TBX21	1,01	2,05	0,14	0,2	0,01

ACTB - β -actina

BAX – proteína X asociada con BCL2

5 CCL2 - ligando de quimiocina (motivo C-C) 2

CCL3 - ligando de quimiocina (motivo C-C) 3

CCL5 - ligando de quimiocina (motivo C-C) 5

CCR5 – receptor de quimiocina (motivo C-C) 5

CSF1 - factor estimulante de colonia 1 (macrófago)

10 CSF2 - factor estimulante de colonia 2 (macrófago-granulocito)

ECE1 - enzima convertora de endotelina 1

FAS – súper familia del receptor de TNF, miembro 6

GNLY - granulicina

GUSB - glucuronidasa- β

15 GZMB - granzima B (granzima 2, esterasa 1 de serina asociada con linfocitos T)

IL1A - α interleucina 1

IL2RA - receptor- α de interleucina 2

IL8 - interleucina 8

IL10 - interleucina 10

20 LTA - linfotóxina α (súper familia de TNF, miembro 1)

PRF1 - perforina 1 (proteína formadora de poros)

PTGS2 – sintasa de prostaglandina-endoperóxido 2 (sintasa y ciclooxigenasa de prostaglandina G/H)

SKI – homólogo del oncógeno viral de sarcoma (aviar) TBX21 - T-box 21

Citotoxicidad de células asesinas naturales combinadas

- 5 En un ensayo de citotoxicidad separado, las células de NK cultivadas derivadas de la sangre del cordón umbilical del donante y el perfusato placentario coincidente fueron células efectoras, mientras que las células tumorales fueron células diana. Las células tumorales se marcaron con PKH26 (Sigma-Aldrich Catálogo # PKH26-GL) (véase, p. ej., Lee-MacAry et al, J. Immunol. Meth. 252(l-2):83-92 (2001)), que se inserta en la membrana plasmática de células debido a su residuo alifático lipofílico, luego se colocó en placas de cultivo de tejidos con base U de 96 pocillos y se incubó con las células de NK cultivadas en varias proporciones efector-diana (E:T) en 200 μ l de RPMI 1640
- 10 adicionado con 10% de FBS. Se incubaron los cultivos durante 4h a 37°C en 5% de CO₂. Después de la incubación, las células se cosecharon y TO-PRO-3 (Invitrogen Catálogo # T3605), un pigmento de ADN impermeable a la membrana, se agregó a los cultivos a una concentración de 1 μ M final seguido de análisis FACS mediante la utilización de BD FACSCanto. La citotoxicidad se expresó como porcentaje de células muertas (PKH26⁺TO-PRO-3⁺) dentro de las células tumorales diana totales PKH26⁺.
- 15 En este ensayo de citotoxicidad, células de linfomamieloide crónico humano (CML) K562 se marcaron con PKH26, que se inserta en la membrana de plasma celular, y se coloca en placas de cultivo de tejido con base U de 96 pocillos. Las células NK de placenta (combo) o de sangre periférica cultivadas durante 21 días se mezclaron con células K562 en proporciones de efector a diana (E:T) de 10:1, 5:1, 2,5:1 y 1,25:1 en RPMI 1640 adicionado con 10% v/v de FBS. Después de un tiempo de incubación de 4 horas, células se cosecharon y TO-PRO-3 se agregó a los cultivos celulares seguido de citometría de flujo para determinar la presencia de PKH26 y TO-PRO-3. La citotoxicidad se expresó como porcentaje de células muertas PKH26⁺TO-PRO-3⁺ dentro de las células tumorales diana totales PKH26⁺. Ambas células NK de placenta y las células NK de sangre periférica mostraron toxicidad sustancial las células K562 en todas las proporciones de E:T analizadas (FIG. 4). Se observó toxicidad significativamente superior de las células NK de placenta que las células NK de sangre periférica hacia las células
- 20 K562 en dos proporciones de E:T, 10:1 y 5:1 (FIG. 4).
- 25

6.4. Ejemplo 4: Citotoxicidad de Perfusato placentario humano hacia las células tumorales

- Este ejemplo demuestra que las células de perfusato placentario humano son citotóxicas para las células tumorales, y que la citotoxicidad de las células nucleadas totales de HPP (TNC-HPP) sobre KG-1a fue superior a la de TNC de UCB coincidente. Las células nucleadas totales de HPP o la sangre del cordón umbilical (UCB) se mezclaron con las células KG-1a en proporciones de 1:1, 5:1, 10:1, 20:1 o 100: 1. Después de 24h o 48h de incubación, las células se cosecharon y se examinaron para determinar la presencia de CFSE mediante análisis FACS (BD FACSCanto, BD Bioscience). Las células tumorales cultivadas solas se usaron como controles. La citotoxicidad se definió como: $(1 - CFSE_{muestra}/CFSE_{control}) * 100\%$. La citotoxicidad significativa se demostró a la proporción de 100:1. Véase la FIG. 5.
- 30

- En un experimento separado, la citotoxicidad de células nucleadas totales de HPP se comparó con la de las células nucleadas totales de la sangre del cordón umbilical. El TNC-HPP o UCV coincidentes se mezcló con las células KG en proporciones de 0,78:1, 1,56:1, 3,12:1, 6,25:1, 12,5:1, 25:1, 50:1 o 100:1. TNC-HPP mostró citotoxicidad consistentemente superior en todas las proporciones comparado con la de UCB. Véase la FIG. 6.
- 35

- En otro experimento, 24 horas antes de la incubación con las células KG-1a, TNC-HPP se estimuló con 100U/ml, o 1000U/ml de IL-2, mientras que el HPP cultivado con medio RPMI se usó como control. A una proporción de 6,25 células NK por célula KG-1a en adelante, IL-2 resulta aumentar la citotoxicidad de TNC-HPP. Véase la FIG. 7.
- 40

Los experimentos se repitieron mediante la utilización de una disposición más amplia de tipos de célula tumoral, como se muestra en la Tabla 12, mediante la utilización de 5×10^5 células HPP y 1×10^4 células tumorales.

Tabla 12: Tipos de célula tumoral analizados para determinar el efecto citotóxico del perfusato placentario

HCC2218	Carcinoma ductal primario humano
CCRF-CEM	Leucemia humana
J.RT3-T3.5	Leucemia de células T aguda humana
K562	Linfoma mielóide crónica humana (CML por sus siglas en inglés)
KG-1	Leucemia mielógena aguda humana
KG-1a	Leucemia mielógena aguda humana (AML por sus siglas en inglés)
KU812	Leucemia humana (CML)
NCI-H1417	Carcinoma de pulmón humano
SNU-CI	Adenocarcinoma de colon humano
U-937	Linfoma histiocítico humano
WERI-RB-1	Retinoblastoma humano
HCT-116	Carcinoma color rectal humano
HT-29	Adenocarcinoma color rectal humano
U266	Mieloma humano

5 Cuando las células HPP y las células tumorales se co-cultivaron durante 24 horas o 48 horas a una proporción de 50: 1, las células HPP mostraron toxicidad sustancial hacia las células tumorales. Para ambas veces, el co-cultivo produjo la muerte de más del 50% de las células tumorales. Véase las FIGS. 8A y 8B.

6.5. Ejemplo 5: Producción de citoquinas por células del perfusato placentario humano durante la exposición a las células tumorales

10 Para determinar el mecanismo de acción primario responsable de mediar los efectos anti-leucémicos potentes de células HPP, el perfil de liberación de citoquinas de las células HPP co-cultivados con líneas celulares de tumor se analizaron, y se compararon con el de las células UCB, en diferentes momentos por ensayo Luminex en multiplex.

15 Los sobrenadantes recolectados después de la incubación se someten a ensayo Luminex para determinar las concentraciones de IFN- γ , TNF- α , y GM-CSF (Cat# HCITO-60K-03, Millipore). Estas tres citoquinas se relacionaron con la citotoxicidad de NK. (véase, p. ej., Imai et al., Blood 2005. 106(l):376-83.). También se realizó RT-PCR cuantitativa para examinar la expresión de IFN- γ , TNF- α , y GM-CSF mediante la utilización del instrumento y los cebadores Applied Biosystems FAST 7900HT. Las condiciones del cultivo fueron las mismas que para los ensayos de citotoxicidad por co-cultivo descritas anteriormente. Las concentraciones de citoquinas se determinaron mediante la utilización de un ensayo Luminex.

20 Se determinó que la secreción de IFN- γ , TNF- α , y GM-CSF de las células HPP co-cultivadas con las células tumorales es significativamente más alta que la de las células UCB. En un experimento, las células HPP se mezclaron con las células KG- 1a en proporciones de 0,78:1, 1,56:1, 3,12:1, 6,25:1, 12,5:1, 25:1, 50:1 o 100:1, en presencia o ausencia de 100 U IL-2. La TNC-HPP mostró una concentración consistentemente mayor de IFN- γ en presencia de IL-2 comparado con la ausencia de IL-2. Se determinó que los niveles de IFN- γ a 24h aumentaron alrededor de 5-26 veces (mediana: 16 veces); a 48h alrededor de 3-65 veces (mediana: 27 veces), lo cual fue consistente con los resultados del estudio de citotoxicidad. Véase la FIG. 9.

25 En otro experimento, 24 horas antes de la incubación con las células KG-1a, TNC-HPP se estimuló con 100U/ml, o 1000U/ml de IL-2, mientras que el HPP cultivado con medios RPMI se usó como control. HPP o las UCB coincidentes se incubaron 24h con o sin IL-2, antes de co-cultivarse con las células KG-1a. La secreción de IFN- γ aumentó mucho más en células HPP co-cultivadas con K562 y KG-1a a 48h. Cuando las células HPP se trataron con 100 U/ml de IL-2, la citotoxicidad de las células HPP en KG-1a a 24h y 48h aumentó. El nivel de secreción de IFN- γ en las células HPP fue superior al de las células UCB coincidentes tras el tratamiento con IL-2. La expresión superior de IFN- γ se confirmó por análisis por RT-PCR de las células de HPP y UCB coincidentes. Estos resultados muestran que células HPP exhiben actividad anti-leucémica superior cuando se compara con células UCB y esta actividad superior está asociada con un aumento significativo en la producción de IFN- γ .

35 La producción de IFN- γ en células HPP, y en células de sangre periférica de cordón umbilical, durante el co-cultivo con un panel de líneas celulares de tumor se analizó mediante la utilización de las líneas de células tumorales enumeradas en la Tabla 1, anterior. Las células HPP y las células tumorales se co-cultivaron durante 24 horas o 48 horas a una proporción de 50: 1, mediante la utilización de 10^4 células tumorales y 5×10^5 células HPP. Para las líneas celulares CCRF-CEM, J.RT3-T3.5, K562, KGI, KG- 1a, KU812, NC1-H1417, U-937 y WERI-RB-I, el aumento en la producción de IFN- γ en células HPP a 24 horas de cultivo concomitante excedió el de las células de sangre

periférica de cordón umbilical co-cultivadas con estas líneas celulares durante el mismo tiempo. Véase la FIG. 10A. A las 48 horas de cultivo concomitante, el aumento en la producción de IFN- γ en células HPP excedió el de la sangre del cordón umbilical para todas las líneas celulares de tumor. Véase la FIG. 10B. de las líneas de células tumorales, las células K562 indujeron el mayor aumento en la producción de IFN- γ en las células HPP tanto a 24 horas como a 48 horas. Se observaron resultados similares para TNF- α y GM-CSF.

El análisis del ciclo celular demostró que el porcentaje de KG-1a en la fase S se redujo un 30% cuando se cultivó en forma concomitante con HPP cuando se compara con las células KG-1a cultivadas solas. Los experimentos de co-cultivo adicionales realizados mediante la utilización de diferentes fracciones enriquecidas de HPP demostraron que la actividad anti-leucémica de HPP se atribuyó en gran medida con la elevada concentración de células asesinas naturales inmaduras únicas caracterizadas por la elevada expresión de CD56⁺, carencia de expresión de CD 16.

6.6. Ejemplo 6: Supresión de la proliferación de células tumorales In Vivo mediante células de perfusato placentario humano

6.6.1. Materiales y métodos

Este ejemplo demuestra la efectividad del perfusato placentario humano in vivo contra las células tumorales mediante la utilización de un modelo de tumor de xenoinjerto de ratón NOD/SCID.

Cultivo de células KG-1. Se mantuvieron células KG-1 en medio de Dulbecco modificado de Iscove adicionado con 20% de suero de feto de bovino (medio de crecimiento) a 37°C en 95% aire/5% CO₂ y 100% de humedad. El medio en el cultivo se cambió día por medio y las células se pasaron semanalmente. Las células KG-1 crecen en suspensiones. Por lo tanto, para cambiar el medio o pasar las células, las suspensiones celulares se recolectaron en tubos centrífugos y se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10 min en un rotor SORV ALL[®] HERAEUS[®] (parte nro. 75006434). El sobrenadante se descartó y una cantidad apropiada de las escamas celulares se suspendió nuevamente en the medio de crecimiento para continuar el cultivo.

Preparación de células KG-1 para implantación. Para la implantación de células a ratones, las células se cosecharon por centrifugado como se describió con anterioridad. Las escamas celulares se recolectaron y se suspendieron nuevamente en solución salina con buffer de fosfato. Para determinar la cantidad de células que se implantarán a los ratones, se contó una alícuota de suspensión celular mediante la utilización de un hemacitómetro. Se usó pigmento Trypan Blue para excluir las células no viables en la suspensión.

Preparación de las células HPP para implantación. Durante el almacenamiento y descongelamiento de HPP, las muestras se recibieron congeladas en un recipiente para embarque en buenas condiciones. Las unidades se almacenaron en el recipiente para envío seco hasta que se descongelaron el 7 de febrero de 2007. El día del descongelamiento, las unidades de HPP se retiraron del criofreezer (una por vez) y se colocaron en bolsas de plástico con cierre superior. Luego se colocaron las bolsas en un baño de agua a 37°C con suave agitación hasta que descongelaron en su mayoría (permaneciendo un trozo congelado pequeño en la bolsa). Las bolsas se retiraron entonces del baño de agua, las unidades se retiraron de las bolsas con cierre superior, y las unidades se invirtieron suavemente hasta que se descongelaron completamente. Las unidades luego se colocaron en una capucha de flujo laminar y la superficie exterior de la bolsa de sangre se esterilizó por aspersión 70% de etanol. Las bolsas de sangre se abrieron por corte mediante la utilización de tijeras estériles, y las células se transfirieron a tubos cónicos estériles de 50 ml (1 tubo para cada unidad de HPP; 2 tubos para cada unidad de UCB) mediante pipeta estéril. Luego, 10 ml de buffer de descongelamiento (2,5% de albúmina humana, 5% dextran 40) se agregó lentamente a cada tubo con suave mezclado (durante un período de 2,2 - 2,9 minutos). Cada bolsa de sangre se enjuagó entonces con 10 ml de buffer de descongelamiento, que luego se agregó al tubo cónico de 50 ml (durante un período de 0,7 - 1,3 min).

Después de descongelar, cada unidad se almacenó sobre hielo húmedo antes del centrifugado. Todos los tubos se centrifugaron durante 10 min (440 x g a 10°C), los sobrenadantes se aspiraron mediante la utilización de pipetas estériles, y las escamas se separaron suavemente por agitación del tubo. Una alícuota de 1 ml de vehículo (PBS + 1% de suero de feto de ternero) se agregó a uno de los tubos, y el tubo se mezcló revolviendo suavemente. Mediante la utilización de una pipeta de 2 ml, los contenidos se transfirieron a un segundo tubo y luego a un tercer tubo y luego a un cuarto tubo. Los tubos vaciados se lavaron con 0,2 ml de buffer de dilución.

Para el recuento celular, una alícuota de 25 μ l se transfirió a un tubo cónico de 15 ml que contiene 975 μ l de vehículo sobre hielo. Los eritrocitos luego se lisaron mediante el agregado de 4 ml de reactivo de lisis de cloruro de amonio frío y se incubaron sobre hielo durante 10 min. Después de la incubación, 5 ml de PBS frío se agregó a cada tubo y los tubos se centrifugaron (10 min, 400 x g, 10°C). Después de la lisis de RBC, las células se contaron mediante hemacitómetro, mediante la utilización de trypan blue para evaluar la viabilidad. Los resultados del recuento se corrigieron para determinar la dilución y luego se dividieron por un factor de lisis (0,46) para estimar la cantidad de células presentes antes de la lisis de RBC.

Para la preparación de la dosis de HPP, después de recontar, las células HPP se diluyeron a 1 x 10⁸ células/ml mediante el agregado de vehículo. Las células HPP luego se almacenaron sobre hielo hasta que se cargaron las

jeringas. El tiempo transcurrido entre el descongelamiento de la primera unidad y la compleción de la preparación de la dosis fue de menos de 3 horas.

5 Antes de llenar las jeringas, una alícuota de 50 µl del material de dosificación se dejó de lado para la verificación posterior a la dosis mediante el recuento como se describió con anterioridad. Después de la administración, el material de la dosis restante se analizó para verificación de la dosis.

10 *Diseño del estudio.* El Día 1, se implantaron veinticuatro ratones NOD/SCID macho (Jackson Laboratories) con 5 millones de células KG-1 viables S/C a la región del flanco. Los ratones se separaron de manera tal que cuatro a cinco ratones se albergaron en un sistema de jaula de micro aislación con lecho de viruta de madera. Se proporcionó comida para roedores esterilizada y agua a voluntad. Los ratones se monitorearon minuciosamente dos veces por semana para determinar el crecimiento tumoral. El primer tumor mensurable se observó el Día 25. Los pesos corporales entonces se registraron una vez por semana y las mediciones del tumor se registraron dos veces con un calibre. El Día 52 después de la implantación, los animales se aleatorizaron en tres grupos separados, con volúmenes de tumor que promedian alrededor de 300-350 mm³. Véase la Tabla 13, a continuación. El primer grupo consistió en cuatro ratones de control con un volumen de tumor promedio de 312 mm³. Dos de estos ratones se implantaron por vía intravenosa (IV), y dos por vía intra-tumoral (IT), con 200 µl y 50 µl de una solución de vehículo, respectivamente. El segundo grupo con un volumen de tumor promedio de 345 mm³ consistió en cuatro ratones implantados por vía intravenosa con 200 µl de células HPP por ratón (2 x 10⁷ células). El último grupo, implantado IT con 50 µl de células HPP por ratón también consistió en cuatro ratones con un volumen de tumor promedio de 332 mm³.

20 Tabla 13: Grupos experimentales para el experimento de supresión del tumor in vivo.

Animal#	Grupo de tratamiento HPP	Volumen de tumor en el día de la implantación de HPP
Grupo 1 (control)		
1	IV 1	457
2	IT 2	429
3	IT 3	214
4	IV 4	147
	Valor medio:	312
Grupo 2 (implantación de célula IV)		
5	1	466
6	2	209
7	3	217
8	4	487
	Valor medio:	345
Grupo 3 (implantación de célula IT)		
9	1	491
10	2	256
11	3	296
12	4	285
	Valor medio:	332
implantación IV-200 uL; implantación IT- 50 uL.		

El Día 66, 14 días después de la implantación de las células HPP, el estudio se terminó debido a altos volúmenes del tumor.

6.6.2. Resultados

5 Los volúmenes del tumor (TV) se midieron hasta el Día 66 (día 14 después de la implantación de células HPP) cuando TV del grupo de control alcanzó un promedio de 2921 mm³. El grupo de tratamiento IV al final del estudio que tenía un promedio TV de 2076 mm³, y el grupo de IT tenía un TV de 2705 mm³. Con respecto al % de aumento en el TV después del tratamiento, el grupo IT mostró un modesto 20% de inhibición en tanto que el grupo IV mostró más del 35% de inhibición del crecimiento tumoral comparado con el grupo de control. La inhibición en el grupo IT fue demostrable. Véase la FIG. 11.

REIVINDICACIONES

1. Células nucleadas humanas del perfusato placentario para usar en un método para el tratamiento de un tumor en un individuo, en donde las células nucleadas humanas del perfusato placentario comprenden células asesinas naturales placentarias intermedias CD56⁺, CD16⁻ y son susceptibles de obtenerse mediante la perfusión de un ser humano placenta que se ha drenado del cordón umbilical y se enjuaga para retirar sangre residual para producir el perfusato placentario que comprende células placentarias nucleadas; y aislamiento de las células placentarias nucleadas de dicho perfusato placentario.
2. Las células nucleadas humanas del perfusato placentario para el uso de la reivindicación 1, en donde dichas células de perfusato comprenden al menos alrededor de 50% células asesinas naturales placentarias intermedias CD56⁺, CD16⁻ que expresan uno o más de los microARNs hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618, o hsa-miR-99a a un nivel detectablemente más alto que las células asesinas naturales de la sangre periférica.
3. Las células nucleadas humanas del perfusato placentario para el uso de la reivindicación 2, en donde dichas células CD56⁺, CD16⁻ expresan uno o más de proteína de aminopeptidasa N, proteína de apolipoproteína E, proteína 1 que interactúa con atrofina-1, proteína inx-3 de inexina, proteína del precursor de integrina alfa-2, precursor de integrina beta-5, proteína del precursor de glicoproteína de la superficie de células madre GP49B, o proteína del receptor 1 de rianodina; y en donde dichas células CD56⁺, CD16⁻ no expresan una o más proteínas precursoras del receptor 4 del factor de crecimiento de fibroblastos, proteína similar nucleótido 4 asociado por inmunidad, proteína del precursor de integrina alfa-L, proteína del precursor beta 2 de integrina, proteína del precursor de integrina beta 4, proteína del precursor de transglicosilada D de mureína lítica unida a la membrana, proteína 8 relacionada con la proteína que se une a oxisterol, o proteína precursora de perforina 1.
4. Las células nucleadas humanas del perfusato placentario para el uso de la reivindicación 1, en donde dichas células de perfusato se usan en una proporción de alrededor de 5 células de perfusato por célula tumoral.
5. Las células nucleadas humanas del perfusato placentario para el uso de la reivindicación 1, en donde dichas células de perfusato se usan en una proporción de alrededor de 10 las células de perfusato por célula tumoral.
6. Las células nucleadas humanas del perfusato placentario para el uso de la reivindicación 1 a 5, en donde el tumor es cáncer de la sangre, o en donde el tumor es un tumor sólido, o en donde el tumor es principalmente carcinoma ductal, leucemia, leucemia de células T agudas, linfoma mielóide crónica (CML), leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica (CML), carcinoma de pulmón, adenocarcinoma de colon, linfoma histiocítico, mieloma múltiple, carcinoma colo-rectal, adenocarcinoma colo-rectal, o retinoblastoma.
7. Células asesinas naturales placentarias intermedias humanas CD56⁺, CD16⁻ para usar en un método para el tratamiento de un tumor en un individuo, en donde dichas células asesinas naturales intermedias placentarias expresan uno o más de los microARNs hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618, o hsa-miR-99a a un nivel detectablemente más alto que las células asesinas naturales de la sangre periférica.
8. Las células asesinas naturales placentarias intermedias humanas CD56⁺, CD16⁻ para el uso de la reivindicación 7, en donde dichas células asesinas naturales placentarias intermedias se contactan con un compuesto modulador inmunológico en una cantidad y durante un tiempo suficiente para dichas células asesinas naturales placentarias intermedias para expresar detectablemente más granzima B que un número equivalente de células asesinas naturales placentarias intermedias que no se contactan con dicho compuesto inmunomodulador, en donde dicho compuesto modulador inmunológico es lenalidomida o pomalidomida.
9. Las células asesinas naturales placentarias intermedias humanas CD56⁺, CD16⁻ para el uso de la reivindicación 7, en donde dichas células asesinas naturales placentarias intermedias se contactan con un compuesto modulador inmunológico en una cantidad y durante un tiempo suficiente para que dichas células asesinas naturales intermedias placentarias exhiban detectablemente más citotoxicidad hacia dichas células tumorales que un número equivalente de células asesinas naturales placentarias intermedias que no se contactan con dicho compuesto modulador inmunológico, en donde dicho compuesto modulador inmunológico es lenalidomida o pomalidomida.
10. Las células asesinas naturales placentarias intermedias humanas CD56⁺, CD16⁻ para el uso de la reivindicación 8 o 9, en donde dichas células asesinas naturales placentarias intermedias expresan uno o más de BAX, CCL5, CD68, CD8A, CSF2, FAS, GUSB o IL2RA a un nivel más alto que un número equivalente de células asesinas naturales placentarias intermedias que no se contactan con dicha lenalidomida o pomalidomida.
11. Las células asesinas naturales placentarias intermedias humanas CD56⁺, CD16⁻ para el uso de la

reivindicación 8 o 9, en donde dichas células asesinas naturales placentarias intermedias expresan uno o más de BAX, CCL2, CCL3, CCL5, CSF1, CSF2, ECE1, FAS, GNLY, GUSB, GZMB, IL1A, IL2RA, IL8, IL10, LTA, PRF1, PTGS2, SKI, o TBX21 a un nivel más alto que un número equivalente de células asesinas naturales placentarias intermedias que no se contactan con dicha lenalidomida o pomalidomida.

- 5 12. Las células asesinas naturales placentarias intermedias humanas CD56⁺, CD16⁻ para el uso de la reivindicación 7 to 11, en donde el tumor es cáncer de la sangre, o en donde el tumor es un tumor sólido, o en donde el tumor es principalmente carcinoma ductal, leucemia, leucemia de células T agudas, linfoma mieloide crónica (CML), leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica (CML), carcinoma de pulmón, adenocarcinoma de colon, linfoma histiocítico, mieloma múltiple, carcinoma colo-rectal, adenocarcinoma colo-rectal, o retinoblastoma.
- 10 13. Células asesinas naturales combinadas para usar en un método de tratamiento de un tumor en un individuo, en donde dichas células asesinas naturales combinadas comprenden CD56⁺, CD16⁻ células asesinas naturales placentarias intermedias aisladas del perfusato placentario y células asesinas naturales aisladas de la sangre del cordón umbilical, en donde dicha sangre del cordón umbilical se aísla de la placenta de la cual se obtiene dicho perfusato placentario, y en donde dichas células asesinas naturales placentarias intermedias expresan uno o más de los microARNs hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618, o hsa-miR-99a a un nivel detectablemente más alto que las células asesinas naturales de la sangre periférica.
- 15 14. Las células asesinas naturales placentarias intermedias humanas CD56⁺, CD16⁻ para el uso de la reivindicación 7 o las células asesinas naturales combinadas para el uso de la reivindicación 13, en donde dichas células asesinas naturales placentarias intermedias comprenden:
- 20 un número detectablemente más alto de células asesinas naturales CD3⁻CD56⁴CD16⁻ que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica;
- 25 un número detectablemente más bajo de CD3⁻CD56⁺CD16⁺ células asesinas naturales que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica;
- un número detectablemente más alto de células asesinas naturales CD3⁻CD56⁺KIR2DL2/L3⁺ que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica;
- un número detectablemente más bajo de células asesinas naturales CD3⁻CD56 SKp46⁺ que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica;
- 30 un número detectablemente más alto de células asesinas naturales CD3⁻CD56⁻SKp30⁺ que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica;
- un número detectablemente más alto de células asesinas naturales CD3⁻CD56⁺2B4⁺ que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica; o
- 35 un número detectablemente más alto de células asesinas naturales CD3⁻CD56⁺CD94⁺ que un número equivalente de células asesinas naturales de la sangre periférica.
- 40 15. Las células asesinas naturales combinadas para el uso de la reivindicación 13 o 14, en donde el tumor es cáncer de la sangre, o en donde el tumor es un tumor sólido, o en donde el tumor es principalmente carcinoma ductal, leucemia, leucemia de células T agudas, linfoma mieloide crónica (CML), leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica (CML), carcinoma de pulmón, adenocarcinoma de colon, linfoma histiocítico, mieloma múltiple, carcinoma colo-rectal, adenocarcinoma colo-rectal, o retinoblastoma.

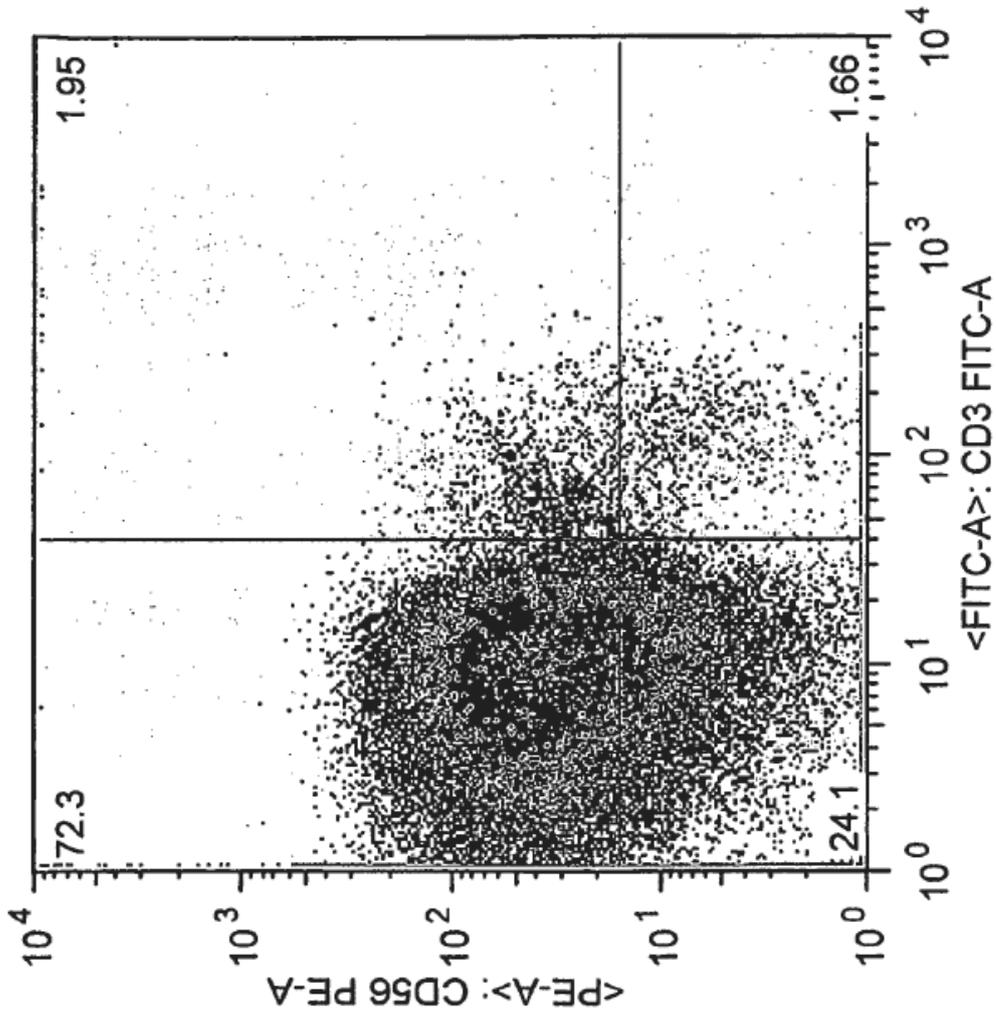


FIG. 1

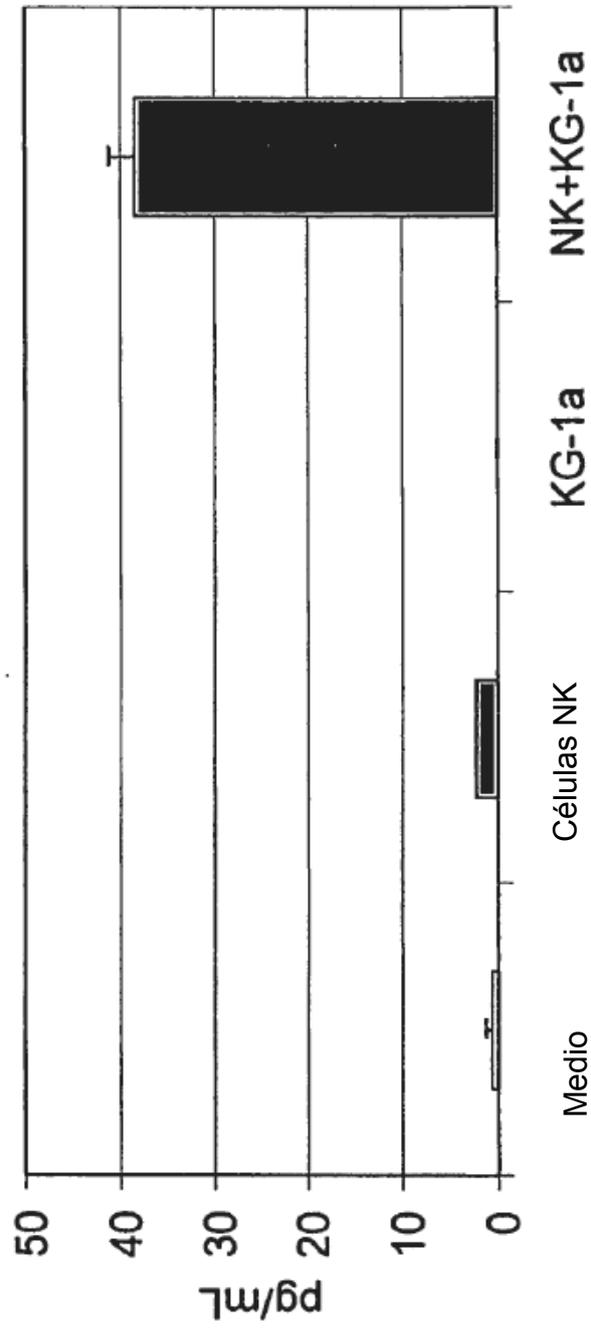


FIG. 2A

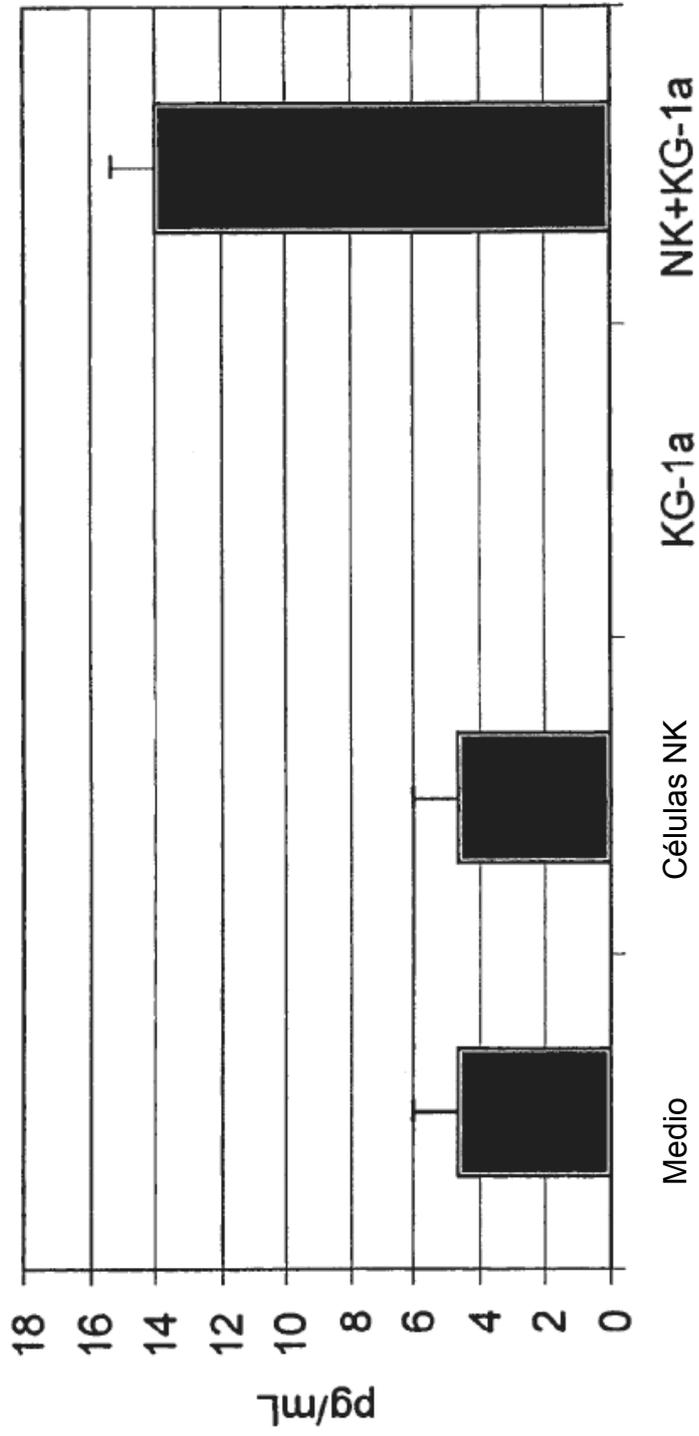


FIG. 2B

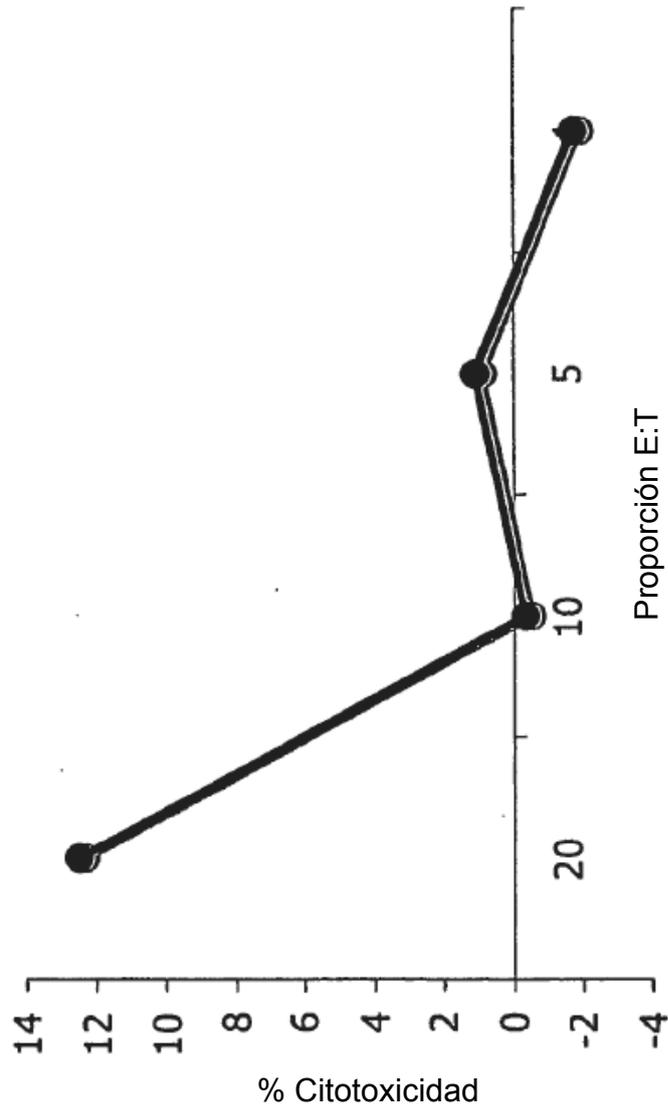


FIG. 3

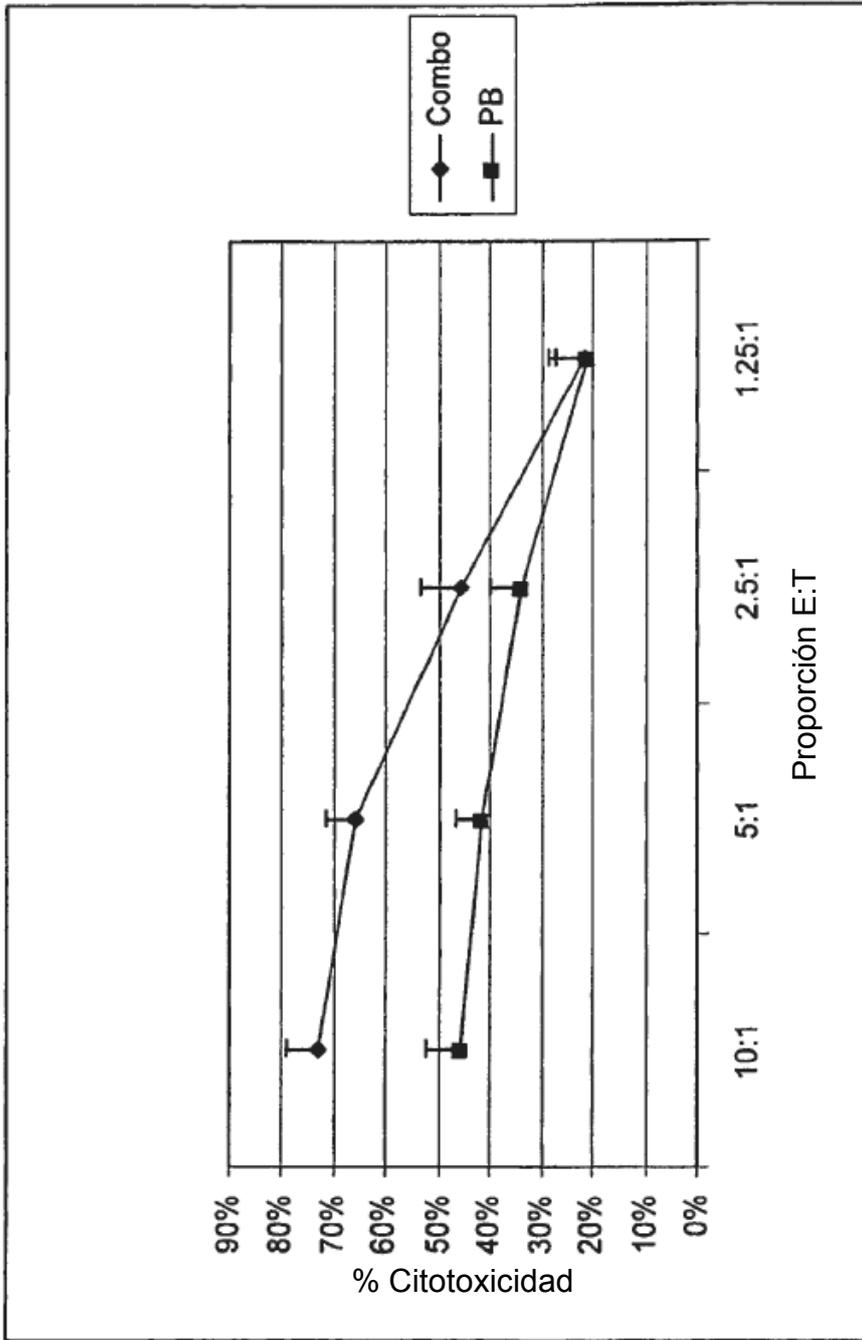


FIG. 4

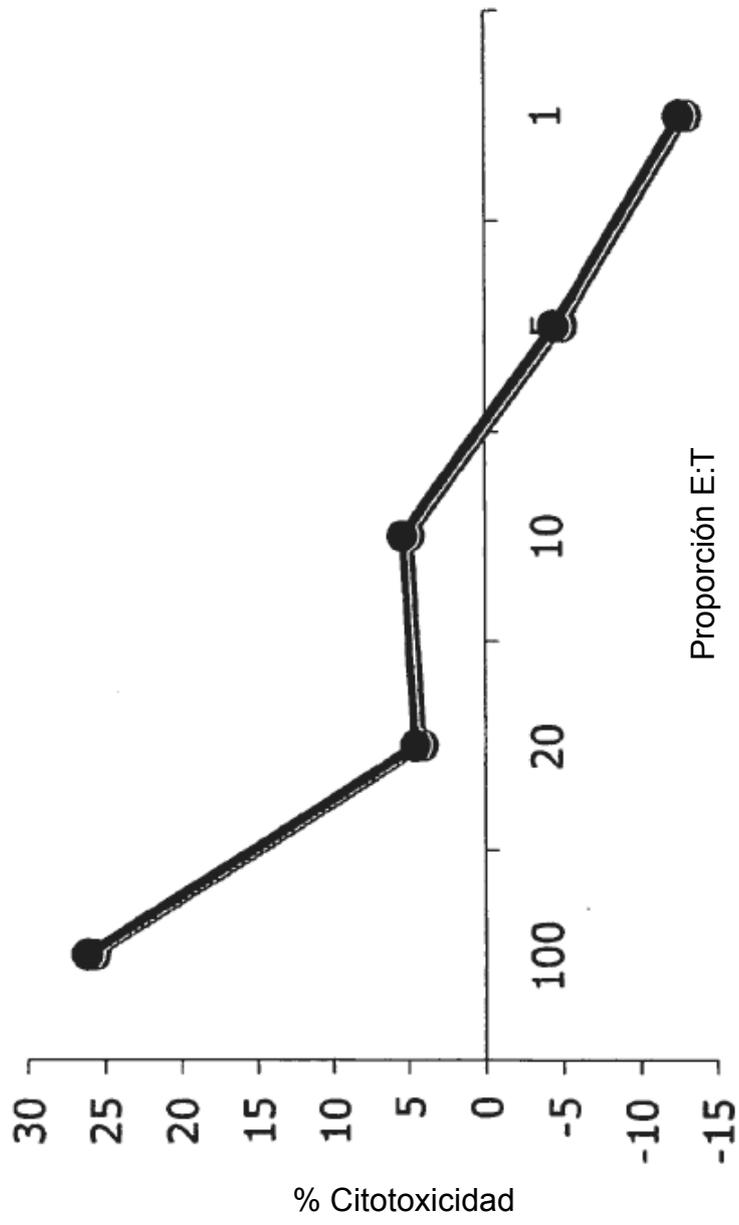


FIG. 5

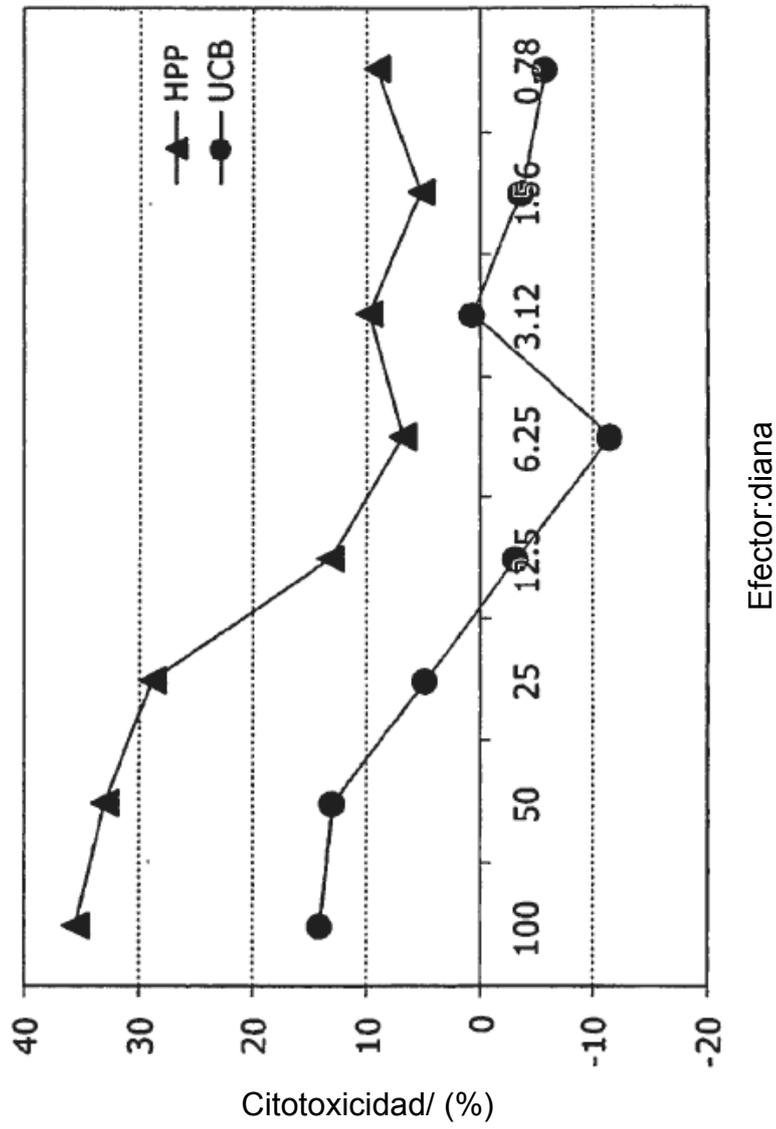


FIG. 6

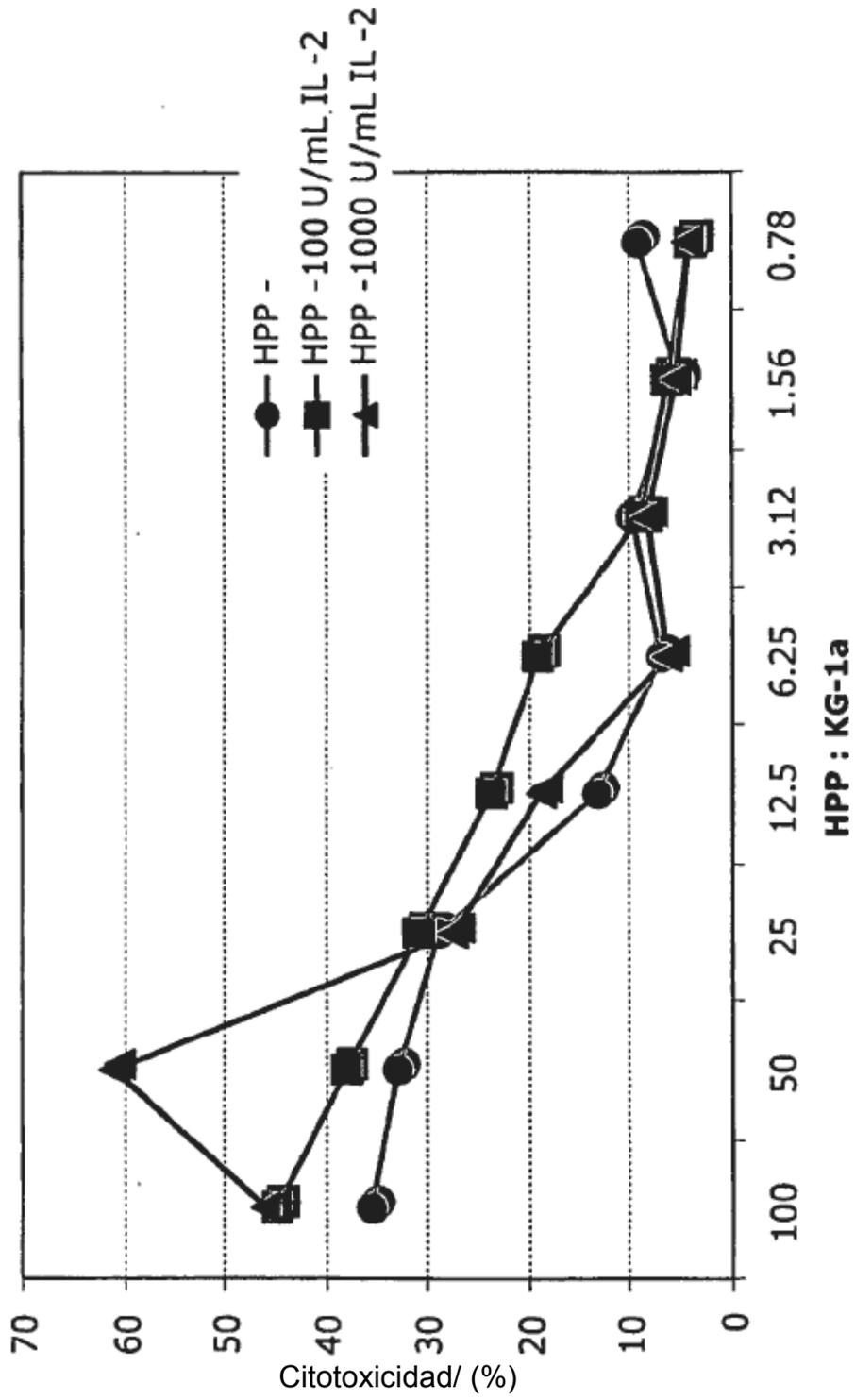
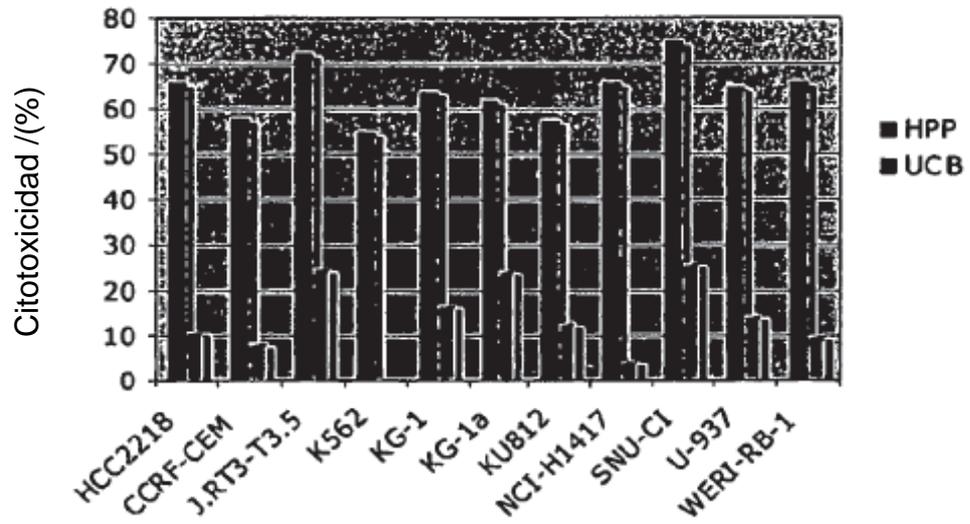
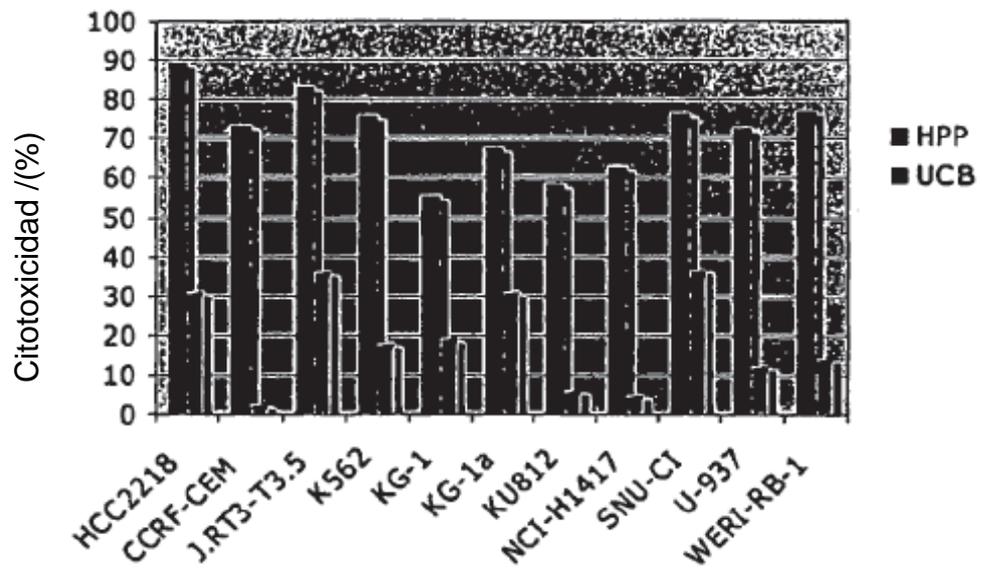


FIG. 7

A



B



FIGS. 8A, 8B

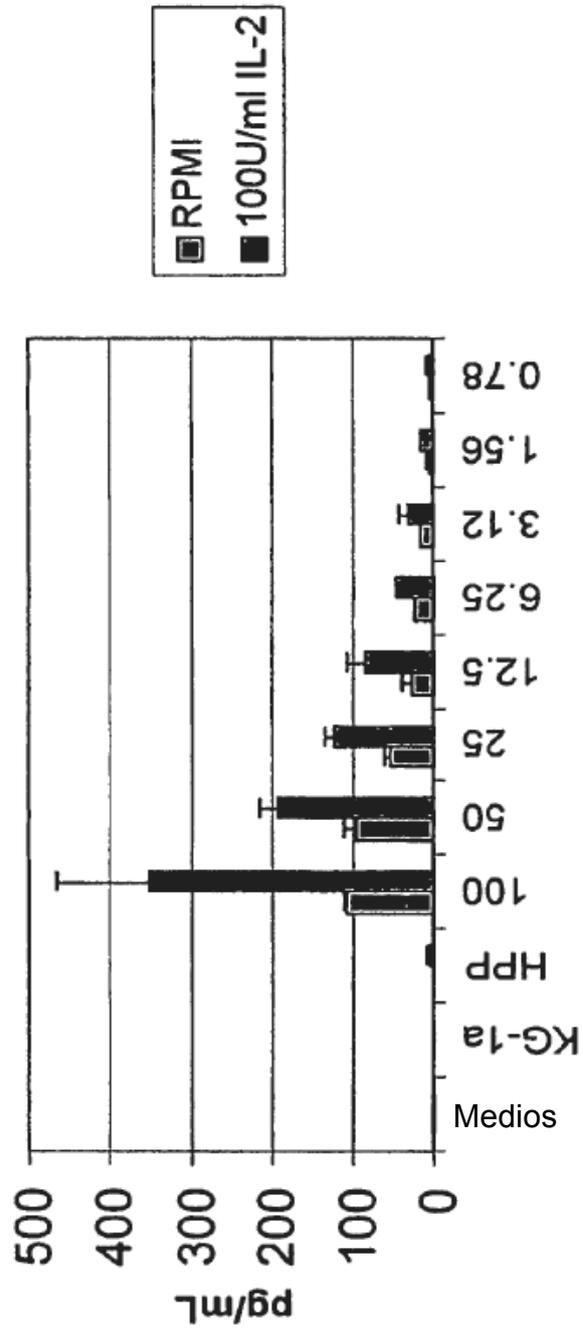
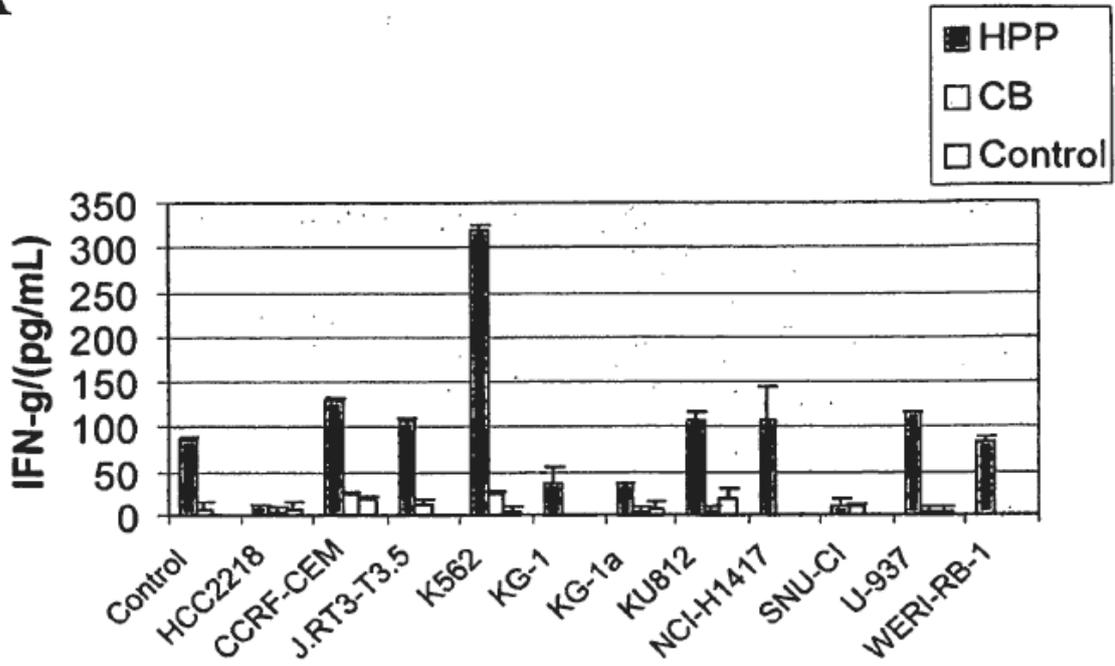
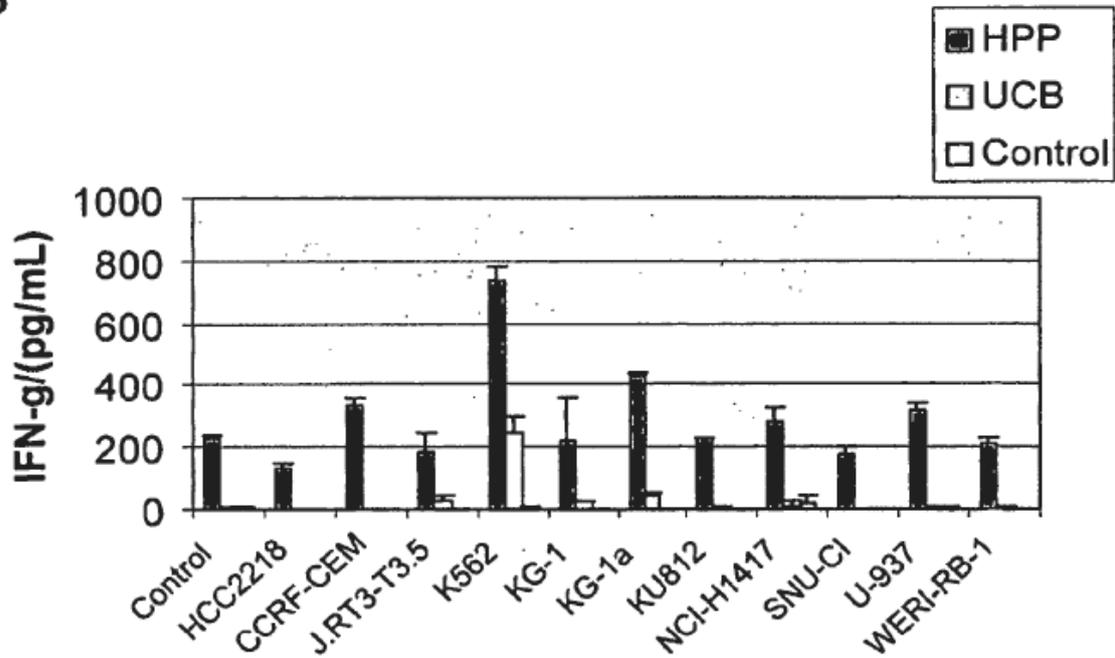


FIG. 9

A



B



FIGS. 10A, 10B

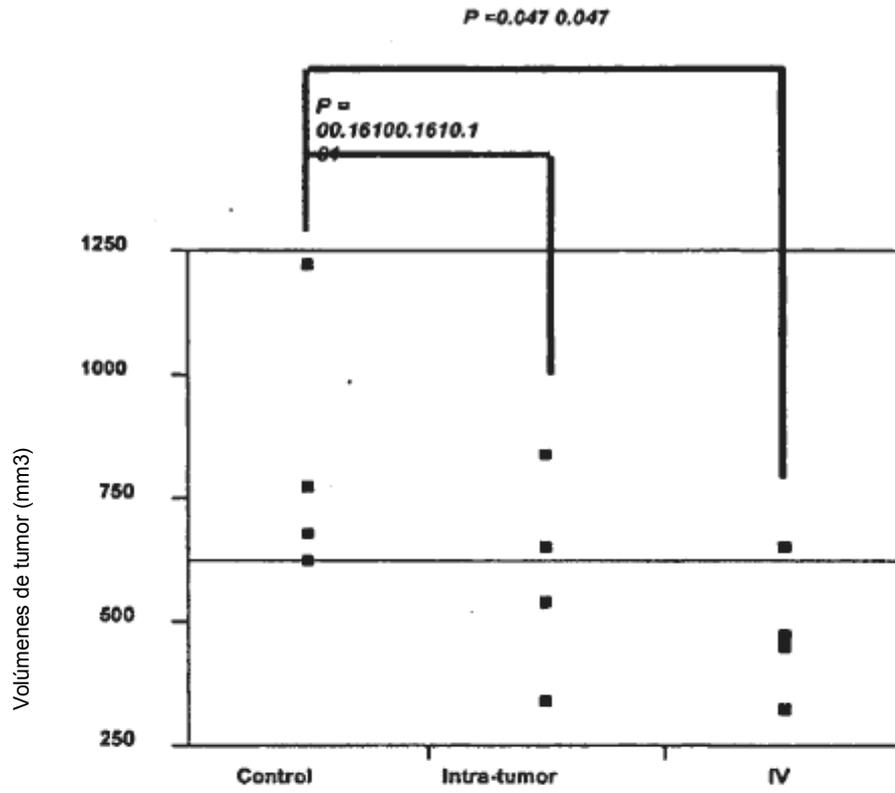


FIG. 11