

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 524**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 35/50 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2010 PCT/US2010/028885**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010 WO10111631**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2010 E 10722830 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2411506**

54 Título: **Supresión tumoral usando linfocitos citolíticos naturales intermedios obtenidos a partir de placenta humana y compuestos inmunomoduladores**

30 Prioridad:

25.03.2009 US 163449 P

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

22.05.2019

73 Titular/es:

**CELULARITY, INC. (100.0%)
33 Technology Drive
Warren, NJ 07059, US**

72 Inventor/es:

**ZHANG, XIAOKUI;
KANG, LIN;
HEIDARAN, MOHAMMAD;
JASKO, STEVEN;
ZEITLIN, ANDY;
PAL, AJAI y
HARIRI, ROBERT J.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 713 524 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 tumoral usando linfocitos citolíticos naturales intermedios obtenidos a partir de placenta humana y compuestos inmunomoduladores

1. Campo

5 En la presente memoria se presentan métodos para tratamiento de infecciones virales y cáncer, *p. ej.*, cánceres hematológicos y tumores sólidos, y para suprimir el crecimiento o proliferación del cáncer, *p. ej.*, células tumorales, usando linfocitos citolíticos naturales aislados de placenta. En ciertas realizaciones, los linfocitos citolíticos naturales se usan en combinación con, o se tratan con, uno o más compuestos inmunomoduladores, *p. ej.*, compuestos inmunomoduladores denominados IMiDs™.

10 2. Antecedentes

El perfundido de placenta comprende la recogida de células de placenta obtenidas por el paso de una solución de perfusión a través de la vasculatura de la placenta, y la recogida del fluido de perfusión de la vasculatura, de la superficie materna de la placenta, o ambos. Los métodos de perfusión de placentas de mamífero se describen, *p. ej.*, en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.045.148 y en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.255.879. La población de células de placenta obtenida por perfusión es heterogénea, comprendiendo células hematopoyéticas (CD34⁺), células nucleadas tales como granulocitos, monocitos y macrófagos, un pequeño porcentaje (menos de un 1 %) de células madre de placenta adherentes a sustrato de cultivo tisular, y linfocitos citolíticos naturales.

Los linfocitos citolíticos naturales (NK) son linfocitos citotóxicos que constituyen un componente principal del sistema inmunológico innato. Los linfocitos NK no expresan receptores antigénicos de linfocitos T (TCR), receptor de CD3 o de linfocitos B de inmunoglobulinas superficiales (Ig), pero normalmente expresan los marcadores de superficie CD16 (FcyRIII) y CD56 en seres humanos. Los linfocitos NK son citotóxicos; gránulos pequeños en su citoplasma contienen proteínas especiales tales como perforina y proteasas conocidas como granzimas. Después de liberarse en las proximidades de una célula programada para matar, la perforina forma por dos en la membrana celular de la célula diana a través de la cual las granzimas y moléculas asociadas pueden entrar, induciendo apoptosis. Una granzima, la granzima B (también conocida como granzima 2 y serina esterasa 1 asociada a linfocitos T citotóxicos), es una serina proteasa fundamental para una inducción rápida de apoptosis de células diana en la respuesta inmunológica mediada por células. La inducción de linfocitos citolíticos naturales (NK) CD16⁺CD56^{brillante} con citotoxicidad antitumoral de linfocitos NK CD16⁺D56^{brillante} y linfocitos NK CD16⁺CD56^{dim} de células mononucleares de sangre periférica humana, y NK para atacar células infectadas con virus ha sido descrita por Takahashi E. *et al* (*Scandinavian Journal of Immunology* 65: 126-138 (2007)).

Los linfocitos NK se activan como respuesta a interferones o citoquinas obtenidas a partir de macrófagos. Los linfocitos NK activados se denominan linfocitos citolíticos activados por linfoquinas (LAK). Los linfocitos NK poseen dos tipos de receptores de superficie, denominados "receptores activantes" y "receptores inhibitorios", que controlan la actividad citotóxica de las células.

Entre otras actividades, los linfocitos NK desempeñan un papel en el rechazo de tumores por el hospedador. Dado que las células cancerosas presentan una reducción o no de la expresión de MHC de clase I, se pueden convertir en dianas de linfocitos NK. Los datos clínicos acumulativos sugieren que el trasplante haploidéntico de linfocitos NK humanos aislados a partir de PBMC o médula ósea puede ayudar a prevenir la recaída del racémico después de trasplante de médula ósea sin causar enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) detectable. Véase Ruggeri *et al.*, *Science* 295: 2097-2100 (2002)). Los linfocitos citolíticos naturales pueden llegar a activarse por células que carecen, o que presentan niveles reducidos de, proteínas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC). Los linfocitos NK y células LAK activados y expandidos se han usado tanto en terapia *ex vivo* como en tratamiento *in vivo* de pacientes que tienen cáncer avanzado, con un cierto éxito contra 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 leucoféresis y a continuación una incubación *ex vivo* y cultivo de las células sanguíneas autónomas recogidas en presencia de IL-2 durante unos pocos días. Las células LAK se deben reinfundir junto con dosis relativamente elevadas de IL-2 para completar la terapia. Este tratamiento de purga es caro y puede producir efectos secundarios graves. Estos incluyen retención de fluidos, edema pulmonar, caída de la presión sanguínea, y fiebre elevada.

A pesar de las propiedades ventajosas de los linfocitos NK para matar células tumorales y células infectadas por virus, sigue siendo difícil trabajar con ellos y aplicarlos en inmunoterapia, debido principalmente a la dificultad para mantener capacidades de dirección a tumor y tumorcidas durante cultivo y expansión. Por lo tanto, en la técnica existe la necesidad de está partido de linfocitos citolíticos naturales.

55 3. Compendio

En la presente memoria se describen métodos para usar perfundido de placenta, células de perfundido de placenta, linfocitos citolíticos naturales de cualquier fuente, *p. ej.*, linfocitos citolíticos naturales de perfundido de placenta, los

5 linfocitos citolíticos naturales obtenidos por digestión de tejido de placenta, o linfocitos citolíticos naturales de otra fuente de tejido, para suprimir la proliferación de células tumorales, tratar la infección vírica o tratar el cáncer, p. ej., cánceres de la sangre y/o tumores sólidos. En ciertos aspectos de la descripción, las células se usan en combinación junto con un compuesto inmunomodulador, p. ej., un compuesto inmunomodulador se describe en la Sección 5.9, que sigue a continuación, o talidomida.

10 La presente invención proporciona linfocitos citolíticos naturales aislados que comprenden linfocitos citolíticos naturales intermedios (PINK) de placenta CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻ aislados para uso en un método para tratamiento de un individuo que tiene cáncer, en donde el método comprende la administración a dicho individuo dichos linfocitos citolíticos naturales aislados que comprenden linfocitos PINK CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻; en donde dichos linfocitos PINK se aíslan a partir de perfundido de placenta ahí expresan uno o más de los microARN 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 elevado que los linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica; y

15 en donde dicho cáncer es leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda de precursores B, leucemia linfoblástica aguda de precursores T, leucemia de Burkitt (linfoma de Burkitt), leucemia bifenotípica aguda, leucemia monocítica crónica, leucemia linfocítica crónica (CLL)/linfoma linfocítica de células pequeñas, leucemia prolinfocítica de linfocitos B; linfoma de células pilosas; leucemia prolinfocítica de linfocitos T, linfoma linfoplasmocítico, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma esplénico de la zona marginal, plasmocitoma, una enfermedad por deposición de inmunoglobulina monoclonal, o una enfermedad de cadena pesada, linfoma de linfocitos B extranodal de la zona marginal (linfoma MALT), linfoma de linfocitos B nodal de la zona marginal (NMZL), linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de linfocitos B grandes y difusos, linfoma mediastínico (tímico) de linfocitos B grandes, linfoma intravascular de linfocitos B grandes, linfoma por efusión primaria, leucemia linfocítica granular de linfocitos T grandes, leucemia de linfocitos NK agresiva, linfoma de linfocitos NK/T extranodal, linfoma de linfocitos T de tipo nasal, de tipo enteropatía, linfoma de linfocitos T hepatoesplénicos, linfoma de linfocitos NK blásticos, micosis fungoide (síndrome de Sezary), un trastorno linfoproliferativo de linfocitos T CD30 positivos cutáneo primario, linfoma macrocítico anaplásico cutáneo primario, papulosis linfomatoide, linfoma de linfocitos T angioinmunoblástico, linfoma periférico de linfocitos T, linfoma macrocítico anaplásico, no especificado, un linfoma de Hodgkin, o un linfoma de Hodgkin con predominio de linfocitos nodulares.

35 En lo sucesivo en la presente memoria, la referencia a linfocitos citolíticos naturales dentro del contexto de la invención se debe entender como una referencia a linfocitos citolíticos naturales que comprenden linfocitos PINK de la invención. De forma coherente con esto, en lo sucesivo en la presente memoria la referencia a linfocitos PINK dentro del contexto de la invención se debe entender como una referencia a linfocitos PINK como se ha definido anteriormente, también denominados linfocitos PINK de la invención.

40 En una realización, el método comprende adicionalmente la administración a dicho individuo de una cantidad eficaz de lenalidomida, pomalidomida, o talidomida. En una realización, dichos linfocitos citolíticos naturales aislados se han puesto en contacto con pomalidomida, lenalidomida, o talidomida antes de dicha administración.

45 En otra realización, los linfocitos citolíticos naturales aislados comprenden linfocitos citolíticos naturales no obtenidos a partir de perfundido de placenta.

50 La presente invención también proporciona linfocitos citolíticos naturales aislados que comprenden linfocitos PINK CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻ aislados para uso en un método para tratamiento de un individuo que tiene una infección vírica, en donde el método comprende la administración a dicho individuo dichos linfocitos citolíticos naturales aislados que comprenden linfocitos PINK aislados de la invención.

En una realización, el método comprende adicionalmente la administración a dicho individuo de una cantidad eficaz de lenalidomida, pomalidomida, o talidomida. En otra realización, los linfocitos citolíticos naturales aislados se han puesto en contacto con pomalidomida, lenalidomida, o talidomida antes de dicha administración.

En otra realización, los linfocitos citolíticos naturales aislados comprenden linfocitos citolíticos naturales no obtenidos a partir de perfundido de placenta.

5 Además, en una realización, los linfocitos citolíticos naturales aislados son linfocitos citolíticos naturales combinados que comprenden linfocitos citolíticos naturales aislados de perfundido de placenta y linfocitos citolíticos naturales aislados de sangre del cordón umbilical. En una realización específica, dicha sangre del cordón umbilical se aísla de la placenta a partir de la que se obtiene dicho perfundido de placenta.

10 En una realización específica, los linfocitos citolíticos naturales aislados son linfocitos citolíticos naturales combinados que comprenden: un número de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺CD16⁺ detectablemente más elevado que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica;

15 un número de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺CD16⁺ detectablemente menor que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica; un número de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺KIR2DL2/L3⁺ detectablemente más elevado que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica; un número de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺NKp46⁺ detectablemente menor que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica; un número de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺NKp30⁺ detectablemente más elevado que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica; un número de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺2B4⁺ detectablemente más elevado que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica; o un número de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺CD94⁺ detectablemente más elevado que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica.

25 En otra realización, los linfocitos citolíticos naturales aislados se ponen en contacto con dicha pomalidomida, lenalidomida, o talidomida en una cantidad durante un periodo de tiempo suficiente para que dichos linfocitos citolíticos naturales expresen de forma detectable más granzima B, o ARNm que codifica granzima B, que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales que no se ponen en contacto con dicha pomalidomida, lenalidomida, o talidomida. En otra realización más, los linfocitos citolíticos naturales aislados para uso en la presente invención no se han cultivado antes de dicha administración.

30 En una realización específica, los linfocitos PINK expresan una o más de proteína aminopeptidasa N, proteína apolipoproteína E, proteína 1 de interacción con atrofina-1, proteína inxina inx-3, proteína precursora de integrina alfa-2, proteína precursora de integrina beta-5, proteína precursora de glicoproteína GP49B de superficie de mastocitos, o proteína del receptor 1 de rianodina; y en donde dichos linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta no expresan una o más de proteína precursora del receptor 4 del factor de crecimiento de fibroblastos, proteína similar al nucleótido 4 asociado a la inmunidad, proteína precursora de integrina alfa-L, proteína precursora de integrina de beta 2, proteína precursora de integrina de beta 4, proteína precursora de mureína transglicosilasa D lítica unida a membrana, proteína 8 relacionada con proteína de unión a oxisterol, o proteína del precursor 1 de perforina 1.

40 En la presente memoria se describen métodos para usar perfundido de placenta, células de perfundido de placenta, linfocitos citolíticos naturales de cualquier fuente, por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales de perfundido de placenta, linfocitos citolíticos naturales obtenidos por digestión de tejido de placenta, o linfocitos citolíticos naturales de otra fuente de tejido, para suprimir la proliferación de células tumorales, tratar infecciones víricas o tratar cáncer, por ejemplo cánceres de la sangre y/o tumores sólidos. En ciertos aspectos de la descripción, las células se usan en combinación con un compuesto inmunomodulador, por ejemplo, un compuesto inmunomodulador descrito en la sección 5.9, a continuación o talidomida.

45 En un aspecto, en la presente memoria se proporcionan linfocitos citolíticos naturales aislados para uso en un método para tratar un individuo que tiene cáncer o una infección vírica, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad eficaz de linfocitos citolíticos naturales aislados. En una realización específica, los linfocitos citolíticos naturales aislados se tratan con, *p. ej.*, se ponen en contacto con, un compuesto inmunomodulador, *p. ej.* Un compuesto inmunomodulador que se describe en la Sección 5.9, que sigue a continuación, o talidomida, antes de dicha administración. En otra realización específica, los linfocitos citolíticos naturales aislados no se tratan con, *p. ej.*, se ponen en contacto con, un compuesto inmunomodulador, *p. ej.* Una talidomida sustituida con aminoy/o un compuesto que se describe en la Sección 5.9, que sigue a continuación, o talidomida, antes de dicha administración. En otra realización específica, el método además comprende adicionalmente la administración al individuo de una cantidad eficaz de un compuesto inmunomodulador o talidomida. En este contexto una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de linfocitos citolíticos naturales, y opcionalmente compuesto inmunomodulador o talidomida, que da como resultado una mejora detectable en uno o más síntomas de dicho cáncer o dicha infección vírica, en

comparación con un individuo que tiene dicho cáncer o dicha infección vírica al que no se le han administrado dichos linfocitos citolíticos naturales y, ocasionalmente, dicho compuesto inmunomodulador o talidomida. En realizaciones específicas, dicho compuesto inmunomodulador es lenalidomida o pomalidomida. En otra realización, dicho cáncer es un tumor sólido. En otra realización, dicho cáncer es un cáncer hematológico. En una realización específica, el

5 cáncer es carcinoma ductal primario, leucemia, leucemia de linfocitos T aguda, linfoma mielóide crónico (CML), leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica (CML), carcinoma de pulmón, adenocarcinoma de colon, linfoma histiocítico, carcinoma colorrectal, adenocarcinoma colorrectal, o retinoblastoma. Según la invención, dichos linfocitos citolíticos naturales comprenden linfocitos citolíticos naturales intermedios (PINK) de placenta CD56⁺, CD16⁻ CD3⁻ de la invención. En una realización específica, dichos linfocitos citolíticos naturales son, o consisten

10 básicamente en, linfocitos citolíticos naturales intermedios (PINK) de placenta CD56⁺, CD16⁻ CD3⁻. En otra realización más específica, dichos linfocitos citolíticos naturales comprenden linfocitos citolíticos naturales no obtenidos a partir de perfundido de placenta. En otra realización más específica, dichos linfocitos citolíticos naturales comprenden linfocitos citolíticos naturales obtenidos a partir de sangre del cordón umbilical o sangre periférica. En otra realización más específica, dichos linfocitos citolíticos naturales son linfocitos citolíticos naturales combinados que comprenden linfocitos citolíticos naturales aislados de perfundido de placenta (*p. ej.*, linfocitos PINK) y linfocitos citolíticos naturales aislados de sangre del cordón umbilical. En una realización más específica, dicha sangre del cordón umbilical se aísla de la placenta a partir de la que se obtiene dicho perfundido de placenta. En otra realización más específica, dicha sangre del cordón umbilical se aísla a partir de una placenta que no es la placenta a partir de la que se obtuvo dicho perfundido de placenta.

20 En otra realización específica, dichos linfocitos citolíticos naturales, y dicho compuesto inmunomodulador o talidomida, se administran por separado a dicho individuo. En otra realización específica, dichos linfocitos citolíticos naturales y dicho compuesto inmunomodulador o talidomida se administran juntos, *p. ej.*, en la misma formulación, o en formulaciones separadas pero al mismo tiempo, a dicho individuo. En otra realización más específica, dichos linfocitos citolíticos naturales son linfocitos citolíticos naturales combinados que comprenden linfocitos citolíticos naturales aislados de perfundido de placenta y linfocitos citolíticos naturales aislados de sangre del cordón umbilical. En una realización más específica, dicha sangre del cordón umbilical se aísla de la placenta a partir de la que se obtiene dicho perfundido de placenta. En otra realización más específica, dicha sangre del cordón umbilical se aísla a partir de una placenta que no es la placenta a partir de la que se obtuvo dicho perfundido de placenta.

30 En otra realización específica, dichos linfocitos citolíticos naturales no se han cultivado antes de dicha administración. En otra realización específica, dichos linfocitos citolíticos naturales se han cultivado antes de dicha administración.

En otro aspecto, en la presente memoria se describe un método para tratar un individuo que tiene cáncer o una infección vírica, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad eficaz de células aisladas de perfundido de placenta, *p. ej.*, células de perfundido de placenta que comprenden linfocitos citolíticos naturales. En un aspecto específico de la descripción, las células aisladas de perfundido de placenta se han tratado previamente con un compuesto inmunomodulador, *p. ej.* Un compuesto inmunomodulador que se describe en la Sección 5.9, que sigue a continuación, o talidomida. En un aspecto específico de la descripción el método comprende adicionalmente la administración a dicho individuo de una cantidad eficaz de un compuesto inmunomodulador o talidomida. En este contexto una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de células de perfundido de placenta, y opcionalmente

40 compuesto inmunomodulador o talidomida, que da como resultado una mejora detectable en uno o más síntomas de dicho cáncer o dicha infección vírica, en comparación con un individuo que tiene dicho cáncer o dicha infección vírica al que no se le han administrado dichas células de perfundido de placenta, y opcionalmente un compuesto inmunomodulador o talidomida. En un aspecto de la descripción, dichas células de perfundido de placenta se tratan previamente con un compuesto inmunomodulador o talidomida. En otro aspecto de la descripción, dichas células de perfundido de placenta no se tratan previamente con un compuesto inmunomodulador o talidomida. En otro aspecto de la descripción, dicho compuesto inmunomodulador es lenalidomida o pomalidomida. En un aspecto específico de la descripción, dicho cáncer es un cáncer hematológico. En un aspecto específico de la descripción, dicho cáncer es carcinoma ductal primario, leucemia, leucemia de linfocitos T aguda, linfoma mielóide crónico (CML), leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica (CML), carcinoma de pulmón, adenocarcinoma de colon, linfoma histiocítico, carcinoma colorrectal, adenocarcinoma colorrectal, o retinoblastoma. En otro aspecto de la descripción, dichas células de perfundido de placenta comprenden linfocitos citolíticos naturales. En otro aspecto de la descripción, dichos linfocitos citolíticos naturales comprenden, consisten básicamente en, o son, linfocitos citolíticos naturales intermedios (PINK) de placenta CD56⁺, CD16⁻. En otro aspecto de la descripción, dichos linfocitos citolíticos naturales se obtienen a partir de sangre del cordón umbilical o sangre periférica. En otro aspecto de la descripción, dichas células de perfundido de placenta se ponen en contacto con un compuesto inmunomodulador o talidomida antes de dicha administración. En un aspecto más específico de la descripción, dichos linfocitos citolíticos naturales en dichas células de perfundido de placenta se ponen en contacto con dicho compuesto inmunomodulador o talidomida en una cantidad durante un periodo de tiempo suficiente para que dichos linfocitos citolíticos naturales expresen de forma detectable más granzima B, o ARNm que codifica granzima B, que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales que no se ponen en contacto con dicho compuesto inmunomodulador o talidomida.

60 En otro aspecto, el método para tratamiento de cáncer que se ha mencionado anteriormente comprende la supresión de la proliferación de células tumorales después de poner en contacto las células tumorales con una cantidad eficaz de los linfocitos citolíticos naturales aislados. En una realización específica, los linfocitos citolíticos naturales aislados

se han tratado previamente con un compuesto inmunomodulador, *p. ej.* Un compuesto inmunomodulador que se describe en la Sección 5.9, que sigue a continuación, o talidomida. En otra realización específica, las células tumorales se ponen en contacto adicionalmente con una cantidad eficaz de un compuesto inmunomodulador o talidomida. En este contexto, una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de linfocitos citolíticos naturales, y opcionalmente un compuesto inmunomodulador o talidomida, que da como resultado una supresión detectable de dichas células tumorales en comparación con un número equivalente de células tumorales que no se ponen en contacto con dichos linfocitos citolíticos naturales, y opcionalmente un compuesto inmunomodulador o talidomida. En una realización más específica, dichos linfocitos citolíticos naturales se tratan previamente con un compuesto inmunomodulador o talidomida. En otra realización más específica, dichos linfocitos citolíticos naturales no se tratan previamente con un compuesto inmunomodulador o talidomida. En una realización específica de este método, las células tumorales son células de cáncer hematológico. En otra realización específica, las células tumorales son células de tumor sólido. En otra realización específica, las células tumorales son células de tumor sólido. En otra realización, la célula tumoral es una célula de carcinoma ductal primario, una célula de leucemia, una célula de leucemia de linfocitos T aguda, 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, célula de mieloma múltiple, una célula de retinoblastoma, una célula de carcinoma colorrectal, o una célula de adenocarcinoma colorrectal. En otra realización específica, dicha puesta en contacto se produce *in vitro*. En otra realización específica, dicha puesta en contacto se produce *in vivo*. En una realización más específica, dicha puesta en contacto *in vivo* se produce en un ser humano. Según la invención, dichos linfocitos citolíticos naturales comprenden linfocitos citolíticos naturales intermedios (PINK) de placenta CD56⁺, CD16⁻ CD3⁻. Según la invención, dichos linfocitos citolíticos naturales son linfocitos citolíticos naturales intermedios (PINK) de placenta CD56⁺, CD16⁻ CD3⁻. En otra realización más específica, dichos linfocitos citolíticos naturales comprenden linfocitos citolíticos naturales no obtenidos a partir de perfundido de placenta. En otra realización más específica, dichos linfocitos citolíticos naturales se obtienen a partir de sangre del cordón umbilical o sangre periférica. En otra realización más específica, dichos linfocitos citolíticos naturales son linfocitos citolíticos naturales combinados que comprenden linfocitos citolíticos naturales aislados de perfundido de placenta y linfocitos citolíticos naturales aislados de sangre del cordón umbilical. En una realización más específica, dicha sangre del cordón umbilical se aísla de la placenta a partir de la que se obtiene dicho perfundido de placenta. En otra realización más específica, dicha sangre del cordón umbilical se aísla a partir de una placenta distinta a partir de la que se obtiene dicho perfundido de placenta.

En otro aspecto, en la presente memoria se describe un método de supresión de la proliferación de células tumorales, ya sea *in vivo* o *in vitro*, que comprende poner en contacto las células tumorales con una cantidad eficaz de células de perfundido de placenta aisladas, *p. ej.*, células de perfundido de placenta que comprenden linfocitos citolíticos naturales de placenta. En un aspecto de la descripción, las células aisladas de perfundido de placenta se han tratado previamente con un compuesto inmunomodulador, *p. ej.* un compuesto inmunomodulador que se describe en la Sección 5.9, que sigue a continuación, o talidomida. En otro aspecto de la descripción, el método comprende adicionalmente poner en contacto las células tumorales con una cantidad eficaz de un compuesto inmunomodulador o talidomida. En este contexto, una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de células de perfundido de placenta, y opcionalmente un compuesto inmunomodulador o talidomida, que da como resultado una supresión detectable de dichas células tumorales en comparación con un número equivalente de células tumorales que no se ponen en contacto con dichas células de perfundido de placenta, y opcionalmente un compuesto inmunomodulador o talidomida. En otro aspecto de la descripción, dichos linfocitos citolíticos naturales se tratan previamente con un compuesto inmunomodulador o talidomida. En otro aspecto de la descripción, dichos linfocitos citolíticos naturales no se tratan previamente con un compuesto inmunomodulador o talidomida. En un aspecto de la descripción, las células son, o comprenden, células nucleadas totales de perfundido de placenta. En otro aspecto de la descripción, dicho perfundido de placenta o células de perfundido de placenta, *p. ej.*, células nucleadas totales de perfundido de placenta, se han tratado para retirar al menos un tipo de célula. En otro aspecto de la descripción, dicha puesta en contacto se produce *in vitro*. En otro aspecto de la descripción, dicha puesta en contacto se produce *in vivo*. dicha puesta en contacto *in vivo* se produce en un mamífero, *p. ej.*, un ser humano. En otro aspecto de la descripción, dichas células de perfundido de placenta se han tratado para enriquecer al menos un tipo de célula, *p. ej.*, células CD56⁺. En otro aspecto de la descripción, dichas células de perfundido de placenta son células de placenta CD56⁺. En otro aspecto de la descripción, las células CD56⁺ son linfocitos citolíticos naturales CD56⁺ CD16⁻, *p. ej.*, linfocitos citolíticos naturales intermedios (PINK) de placenta, *p. ej.*, obtenidos a partir de células de perfundido de placenta o células de placenta obtenidas mediante interrupción mecánica o enzimática de tejido de placenta. En otro aspecto de la descripción, dichas células CD56⁺ se seleccionan mediante el microperlas conjugadas con CD56. en otro aspecto de la descripción, dichas células CD56⁺ comprenden células que presentan una expresión de NKG2D, NKp46 o CD94 detectablemente más baja, tal como se determina, *p. ej.*, mediante citometría de flujo, que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales CD56⁺ CD16⁺. En otro aspecto de la descripción, los linfocitos PINK son CD3⁻. En otro aspecto de la descripción, al menos. 50 % of de las células en dichas células de perfundido de placenta son dichas células CD56⁺. En un aspecto de la descripción, en donde las células CD56⁺ son al menos un 50 % de dichas células de perfundido de placenta, las células tumorales son células de carcinoma ductal primario, células de leucemia, células de leucemia de linfocitos T aguda, células de linfoma mielóide crónico (CML), células de leucemia mielógena aguda, células de leucemia mielógena crónica (CML), células de carcinoma de pulmón, células de adenocarcinoma de colon, células de linfoma histiocítico, células de mieloma múltiple, células de retinoblastoma, células de carcinoma colorrectal o células de adenocarcinoma

colorrectal. En aspectos específicos de la descripción, dicha puesta en contacto expuesta en contacto *in vitro*. En otro aspecto de la descripción, dicha puesta en contacto expuesta en contacto *in vivo*, *p. ej.*, en un mamífero, *p. ej.*, un ser humano.

5 En una realización específica de los métodos que se han mencionado anteriormente que usan células de perfundido de placenta, dicho perfundido de placenta es perfundido que se ha pasado a través de vasculatura de la placenta, *p. ej.*, solo a través de vasculatura de la placenta. En otra realización específica, dicho perfundido de placenta se ha pasado a través de la vasculatura de la placenta y se ha recogido de la cara materna de la placenta. En otra realización específica, todas, o básicamente todas (*p. ej.*, más de un 90 %, un 95 %, un 98 % o un 99 %) de células en dicho perfundido de placenta son células fetales. En otra realización específica, el perfundido de placenta
10 comprende células fetales y maternas. En una realización más específica, las células fetales en dicho perfundido de placenta comprenden menos de aproximadamente un 90 %, un 80 %, un 70 %, un 60 % o un 50 % de las células en dicho perfundido. En otra realización específica, dicho perfundido se obtiene mediante el paso de una solución de NaCl al 0,9 % a través de la vasculatura de la placenta. En otra realización específica, dicho perfundido comprende un medio de cultivo. En otra realización específica, dicho perfundido se ha tratado para retirar eritrocitos.

15 En otra realización específica de los métodos que se han mencionado anteriormente, los linfocitos citolíticos naturales comprenden células que presentan una expresión detectablemente menor de NKG2D, NKp46 o CD94, tal como se determina, *p. ej.*, mediante citometría de flujo, que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales CD56⁺CD16⁺. En otra realización específica, dichos linfocitos citolíticos naturales comprenden linfocitos PINK de la invención, que expresan uno o más de los microARN hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-
20 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-520 g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618, y/o hsa-miR-99a a un nivel detectablemente más elevado que los linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica, tal como se determina, *p. ej.*, mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). En otra realización, los linfocitos citolíticos naturales no expresan el microARN hsa-miR-199b, o expresan el microARN hsa-miR-199b a un nivel
25 detectablemente menor que los linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica.

En otra realización específica de la presente invención, dichos linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos PINK, se ponen en contacto con un compuesto inmunomodulador o talidomida en una cantidad durante un periodo de tiempo suficiente para que dichos linfocitos citolíticos naturales expresen de forma detectable más granzima B o perforina que un número equivalente de dichos linfocitos citolíticos naturales que no se ponen en contacto con dicho
30 compuesto inmunomodulador o talidomida. En otra realización específica, dichos linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos PINK, se ponen en contacto con un compuesto inmunomodulador o talidomida en una cantidad y durante un periodo de tiempo suficiente para que dichos linfocitos citolíticos naturales presenten de forma detectable más citotoxicidad hacia dichas células tumorales que un número equivalente de dichos linfocitos citolíticos naturales que no se ponen en contacto con dicho compuesto inmunomodulador, *p. ej.*, lenalidomida o pomalidomida, o con
35 talidomida. En otra realización específica, dichos linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos PINK, expresan uno o más de BAX, CCL5, CCR5, CSF2, FAS, GUSB, IL2RA, o TNFRSF18 a un nivel más elevado que un número equivalente de dichos linfocitos citolíticos naturales que no se pone en contacto con dicho compuesto inmunomodulador o talidomida. En otra realización específica, dichos linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos PINK, expresan uno o más de ACTB, BAX, CCL2, CCL3, CCL5, CCR5, CSF1, CSF2, ECE1, FAS, GNLY, GUSB,
40 GZMB, IL1A, IL2RA, IL8, IL10, LTA, PRF1, PTGS2, SKI, y TBX21 a un nivel más elevado que un número equivalente de dichos linfocitos citolíticos naturales que no se ponen en contacto con dicho compuesto inmunomodulador o talidomida.

En ciertas realizaciones en los métodos de tratamiento o supresión tumoral que se han mencionado anteriormente, los linfocitos citolíticos naturales de placenta se combinan con linfocitos citolíticos naturales de sangre del cordón
45 umbilical para formar linfocitos citolíticos naturales combinados. Como se usa en la presente memoria, la expresión "linfocitos(s) citolítico natural de placenta" no incluye linfocitos citolíticos naturales de sangre del cordón umbilical o sangre de placenta. En realizaciones más específicas, los linfocitos citolíticos naturales de placenta se combinan con linfocitos citolíticos naturales de otra fuente en una proporción de aproximadamente 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20,
50 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 similar.

En una realización específica de la presente invención, los linfocitos citolíticos naturales combinados no se cultivan, y comprenden: un número detectablemente más elevado de linfocitos citolíticos naturales que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺CD16⁺ de sangre periférica; un número detectablemente
55 menor de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺CD16⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica; un número detectablemente más elevado de CD3⁺ CD56⁺KIR2DL2/L3⁺ linfocitos citolíticos naturales que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica; un número detectablemente menor de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺NKp46⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica; un número detectablemente más elevado de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺NKp30⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica; un número
60 detectablemente más elevado de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺2B4⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica; o un número detectablemente más elevado de linfocitos citolíticos

5 naturales CD3⁻CD56⁺CD94⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica. En otras realizaciones específicas, los linfocitos citolíticos naturales combinados se cultivan y comprenden: un número detectablemente menor de linfocitos citolíticos naturales CD3⁻CD56⁺KIR2DL2/L3⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica; un número detectablemente más elevado de linfocitos citolíticos naturales CD3⁻CD56⁺NKp46⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica; un número detectablemente más elevado de linfocitos citolíticos naturales CD3⁻CD56⁺NKp44⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica; un número detectablemente más elevado de linfocitos citolíticos naturales CD3⁻CD56⁺NKp30⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica.

10 En una realización específica de la presente invención, la célula tumoral es una célula de tumor sólido. En otra realización específica, la célula tumoral es una célula de tumor líquido, p. ej., una célula tumoral sanguínea. En realizaciones más específicas, la célula tumoral es una célula de carcinoma ductal primario, una célula de leucemia, una célula de leucemia de linfocitos T aguda, 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, célula de mieloma múltiple, una célula de retinoblastoma, una célula de carcinoma colorrectal o una célula de adenocarcinoma colorrectal.

20 En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona una composición que comprende linfocitos citolíticos naturales que comprenden linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻, es decir, linfocitos PINK para uso en un método para tratamiento de cáncer o tratamiento de una infección vírica. En una realización específica, dichos linfocitos citolíticos naturales de placenta se aíslan de perfundido de placenta. En otra realización específica, dichos linfocitos citolíticos naturales de placenta se aíslan de placenta mediante interrupción física y/o digestión enzimática de tejido de placenta. En otra realización específica, dichos linfocitos citolíticos naturales comprenden al menos un 50 % de células en la composición. En una realización específica, dichos linfocitos citolíticos naturales comprenden al menos un 80 % de células en la composición. En otra realización específica, dicha composición comprende linfocitos citolíticos naturales CD56⁺, CD16⁺ aislados. En una realización más específica, dichos linfocitos citolíticos naturales CD56⁺, CD16⁺ son de un individuo diferente al de dichos linfocitos citolíticos naturales CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻. En otra realización específica, dichos linfocitos PINK CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻ son de un solo individuo. En una realización más específica, linfocitos PINK CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻ aislados comprenden linfocitos PINK de al menos dos individuos diferentes. En otra realización específica, dichos linfocitos citolíticos naturales de placenta, p. ej., dichos linfocitos PINK, se expanden. En otra realización específica, dichos linfocitos citolíticos naturales, p. ej., linfocitos PINK, se han puesto en contacto con un compuesto inmunomodulador o talidomida en una cantidad durante un período de tiempo suficiente para que dichos linfocitos citolíticos naturales expresen de forma detectable más granzima B o perforina que un número equivalente de dichos linfocitos citolíticos naturales que no se ponen en contacto con dicho compuesto inmunomodulador o talidomida. En otra realización específica, dicha composición comprende adicionalmente un compuesto inmunomodulador o talidomida.

40 En una realización más específica, la composición comprende linfocitos citolíticos naturales de placenta y linfocitos citolíticos naturales de otra fuente. En una realización específica, dicha otra fuente es sangre de placenta y/o sangre del cordón umbilical. En otra realización específica, dicha otra fuente es sangre periférica. En realizaciones más específicas, los linfocitos citolíticos naturales de placenta se combinan con linfocitos citolíticos naturales de otra fuente en una proporción de aproximadamente 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 similar.

45 En otra realización específica, la composición comprende perfundido de placenta aislado. En una realización específica, dicho perfundido de placenta es del mismo individuo que dichos linfocitos citolíticos naturales. En otra realización más específica, dicho perfundido de placenta comprende perfundido de placenta de un individuo diferente al de dichos linfocitos citolíticos naturales. En otra realización específica, todas, o básicamente todas (p. ej., más de un 90 %, un 95 %, un 98 % o un 99 %) de células en dicho perfundido de placenta son células fetales. En otra realización específica, el perfundido de placenta comprende células fetales y maternas. En una realización más específica, las células fetales en dicho perfundido de placenta comprenden menos de aproximadamente un 90 %, un 80 %, un 70 %, un 60 % o un 50 % de las células de dicho perfundido. En otra realización específica, dicho perfundido se obtiene mediante el paso de una solución de NaCl al 0,9 % a través de la vasculatura de la placenta. En otra realización específica, dicho perfundido comprende un medio de cultivo. En otra realización específica, dicho perfundido se ha tratado para retirar eritrocitos. En otra realización específica, dicha composición comprende un compuesto inmunomodulador.

60 En otra realización específica, la composición comprende células de perfundido de placenta. En una realización más específica, dichas células de perfundido de placenta son del mismo individuo que dichos linfocitos citolíticos naturales. En otra realización más específica, dichas células de perfundido de placenta son de un individuo diferente al de dichos linfocitos citolíticos naturales. En otra realización específica, la composición comprende perfundido de placenta aislado y células de perfundido de placenta aislado, en donde dicho perfundido aislado y dichas células de perfundido de placenta aislado son de diferentes individuos. En otra realización más específica de cualquiera de las

realizaciones que se han mencionado anteriormente que comprenden perfundido de placenta, dicho perfundido de placenta comprende perfundido de placenta de al menos dos individuos. En otra realización más específica de cualquiera de las realizaciones que se han mencionado anteriormente que comprenden células de perfundido de placenta, dichas células de perfundido de placenta aislado son de al menos dos individuos. La composición puede comprender adicionalmente comprenden linfocitos PINK aislados, en donde los linfocitos PINK son de un individuo diferente al de dicho perfundido de placenta o dichas células de perfundido. En otra realización específica, dicha composición comprende un compuesto inmunomodulador o talidomida.

3.1. Definiciones

Como se usa en la presente memoria, los "linfocitos citolíticos naturales combinados" son linfocitos citolíticos naturales de sangre del cordón umbilical y perfundido de placenta. En ciertas realizaciones, los linfocitos citolíticos naturales son de sangre del cordón umbilical y perfundido de placenta humano emparejados, en donde el perfundido de placenta se obtiene a partir de la misma placenta que la sangre del cordón umbilical. Los linfocitos citolíticos naturales tanto de perfundido de placenta como de sangre del cordón umbilical se aíslan por separado o al mismo tiempo, y se combinan.

Como se usa en la presente memoria, las expresiones "compuesto inmunomodulador" e "IMiD" no incluyen talidomida.

Como se usa en la presente memoria, "lenalidomida" se refiere a 3-(4'-aminoisindolin-1'-ona)-1-piperidin-2,6-diona (nombre del Chemical Abstracts Service) o 2,6-Piperidindiona,3-(4-amino-1,3-dihidro-1-oxo-2H-isindol-2-il)- (nombre de la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)).

Como se usa en la presente memoria, "multipotente", cuando se refiere a una célula, se refiere a que la célula tiene la capacidad de diferenciarse en una célula de otro tipo celular. En ciertas realizaciones, "una célula multipotente" es una célula que tiene la capacidad de crecer en cualquier subconjunto de aproximadamente 260 tipos de células del cuerpo de mamífero. A diferencia de una célula pluripotente, una célula multipotente no tiene la capacidad de formar todos los tipos de células.

Como se usa en la presente memoria, "linfocito citolítico natural", sin modificación adicional, incluyen linfocitos citolíticos naturales de cualquier fuente de tejido.

Como se usa en la presente memoria, "PINK" y "linfocitos PINK" se refieren a un tipo de linfocitos citolítico natural, denominados linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta, que se obtienen a partir de la placenta humana, p. ej., perfundido de placenta o tejido de placenta humanos que se han interrumpido por vía mecánica y/o por vía enzimática. Las células son CD56⁺ y CD16⁻, p. ej., tal como se determina mediante citometría de flujo, p. ej., clasificación celular activada por fluorescencia usando anticuerpos para CD56 y CD16. Los linfocitos PINK no se obtienen de sangre del cordón umbilical o de sangre periférica. Las células son citolíticas en un ensayo para actividad citolítica, p. ej., usando una línea de células tumorales tal como células tumorales K562 como células diana.

Como se usa en la presente memoria, "perfundido de placenta" se refiere a una 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 recogidas por la solución de perfusión durante el paso a través de la placenta.

Como se usa en la presente memoria, "células de perfundido de placenta" se refiere a células nucleadas, p. ej., células nucleadas totales, aisladas de, o que se pueden aislar de, perfundido de placenta.

Como se usa en la presente memoria, "pomalidomida" se refiere a 4-amino-2-[(3RS)-2,6-dioxopiperidin-3-il]-1H-isindol-1,3(2H)-diona.

Como se usa en la presente memoria, "supresión de células tumorales", "supresión de la proliferación de células tumorales", y similares, incluye la ralentización del crecimiento de la población de células tumorales, p. ej., eliminando una o más de las células tumorales en dicha población de células tumorales, por ejemplo, poniendo en contacto la población de células tumorales con linfocitos PINK, una población de células que comprende linfocitos PINK, linfocitos citolíticos naturales combinados, una población de células que comprende linfocitos citolíticos naturales combinados, perfundido de placenta humano, o similares.

4. Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra resultados de citometría de flujo usando anticuerpos anti-CD3 y anticuerpos anti-CD56 para células seleccionadas mediante micropérlas de CD56 de perfundido de placenta humana (HPP). La mayoría de las células aisladas CD56⁺CD3⁻.

Las FIGS. 2A y 2B representan la producción de citoquinas por linfocitos PINK y/o células tumorales durante cultivo de 24 horas. La FIG. 2A representa la secreción de interferón gamma (IFN γ) por células de linfocitos citolíticos

- naturales (PINK) intermedios obtenidos a partir de perfundido de placenta solo o en presencia de células tumorales KG-1a. Los linfocitos PINK y las células KG-1a se cultivaron solas o en combinación a una proporción de 1:1. Eje Y: picogramas de IFN γ producidos por los cultivos. La FIG. 2B representa secreción de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) por linfocitos PINK solos o en presencia de células tumorales KG-1a. Los linfocitos PINK y las células KG-1a se cultivaron solas o en combinación a una proporción de 1:1. Eje Y: picogramas de GM-CSF producidos por los cultivos.
- La FIG. 3 representa citotoxicidad de linfocitos PINK con respecto a células tumorales KG-1a en co-cultivo de 24 horas a una proporción de 1:1,5:1, 10:1 o 20:1 de linfocitos PINK con respecto a células tumorales. Eje X: proporción de linfocitos PINK con respecto a células tumorales. Eje Y: porcentaje de células tumorales muertas comparadas con respecto a células tumorales sin linfocitos PINK.
- La FIG. 4 representa citotoxicidad de linfocitos NK de placenta y (PB) linfocitos NK de sangre periférica cultivados durante 21 días hacia células K562. Las barras de error representan desviación típica de 4 unidades de linfocitos NK de placenta cultivados o 3 unidades de linfocitos NK de sangre periférica cultivados.
- La FIG. 5 representa citotoxicidad de perfundido de placenta de sangre completa, tal como se obtiene a partir de la placenta, con respecto a células tumorales KG-1a en co-cultivo de 24 horas a una proporción de 1:1, 5:1, 10:1 o 20:1 o y 100:1 de células HPP con respecto a células tumorales. Eje X: proporción de células HPP con respecto a células tumorales. Eje Y: porcentaje de células tumorales muertas comparadas con respecto a células tumorales sin células HPP.
- La FIG. 6 representa citotoxicidad de perfundido de placenta humana completa, tal como se obtiene a partir de la placenta, y sangre del cordón umbilical, para células tumorales KG-1a en co-cultivo de 48 horas en dilución es en serio 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 con respecto a células tumorales. Eje X: proporción de células HPP o células del cordón umbilical con respecto a células tumorales. Eje Y: porcentaje de células tumorales muertas después de 48 horas de tiempo de cultivo comparado con respecto a células tumorales sin células HPP o células del cordón umbilical.
- La FIG. 7 representa citotoxicidad de perfundido de placenta humana completa, tal como se obtiene a partir de la placenta para células tumorales KG-1a en co-cultivo de 48 horas en diluciones en serie de 100:1, 50:1, 25:1, 12,5:1, 6,25:1, 3,12:1, 1,56:1 o 0,78:1 de células HPP con respecto a células tumorales. El perfundido se usó tal como se recogió, o se estimuló durante 24 horas con 100 U/ml o 1000 U/ml de interleuquina-2 (IL-2). Eje X: proporción de células HPP con respecto a células tumorales. Eje Y: porcentaje de células tumorales muertas después de 48 horas de tiempo de cultivo comparado con respecto a células tumorales sin células HPP.
- Las FIGS. 8A y 8B representan el efecto citotóxico de perfundido de placenta humana hacia un panel de líneas de células tumorales después de cultivo con células HPP o UCB a una proporción de 50:1 con respecto a las células tumorales. FIG 8A: co-cultivo durante 24 horas. FIG. 8B: co-cultivo durante 48 horas. Eje X: líneas de células tumorales sometida a ensayo. Eje Y: porcentaje de células tumorales muertas después de co-cultivo, en comparación con el número de células tumorales en ausencia de células tumorales.
- La FIG. 9 representa la producción de IFN γ por células HPP co-cultivadas con células tumorales KG-1a a diferentes proporciones de células HPP con respecto a células tumorales. Eje X: Condiciones experimentales, incluyendo proporción de células HPP con respecto a células tumorales Eje Y: niveles de IFN γ por mililitro después de 24 horas de co-cultivo.
- FIGS. 10A y 10B Producción de IFN γ por células HPP o UCB en co-cultivo con un panel de células tumorales. Las células HPP o UCB se co-cultivaron a una proporción de 50:1 con líneas de células tumorales durante 24 horas (FIG. 10A) o 48 horas (FIG. 10B). Los niveles de IFN γ se determinaron con el ensayo Luminex (HCYTO-60K-03, Millipore). Eje X: líneas de células tumorales sometida a ensayo. Eje Y: picogramas de IFN γ producidos por células HPP o UCB, en comparación con picogramas de IFN γ producidos en ausencia de células tumorales.
- La FIG. 11 representa la reducción del tamaño tumoral después de la administración de 2×10^7 células de perfundido de placenta humana (HPP) a ratones con tumores de células KG-1 con un volumen de aproximadamente 332 mm^3 . Intra-tumor - las células HPP se inyectaron directamente en el sitio del tumor subcutáneo. IV - las células HPP administradas por vía intravenosa. Control - administración de vehículos solo. Volúmenes tumorales en mm^3 .

5. Descripción detallada

- La presente invención proporciona linfocitos citolíticos naturales aislados que comprenden linfocitos citolíticos naturales de placenta intermedios (PINK) CD56 $^+$, CD16 $^-$, CD3 $^-$ para uso en un método para tratamiento de un individuo que tiene cáncer, en donde el método comprende la administración a dicho individuo dichos linfocitos citolíticos naturales aislados que comprenden linfocitos PINK CD56 $^+$, CD16 $^-$, CD3 $^-$, en donde dichos linfocitos PINK se aíslan a partir de perfundido de placenta y expresan uno o más de los microARN 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-520 g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618, o hsa-miR-99a a un nivel detectablemente más elevado que los linfocitos citolíticos naturales de

sangre periférica; y

5 en donde dicho cáncer es leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda de precursores B, leucemia linfoblástica aguda de precursores T, leucemia de Burkitt (linfoma de Burkitt), leucemia bifenotípica aguda, leucemia monocítica crónica, leucemia linfocítica crónica (CLL)/linfoma linfocítica de células pequeñas, leucemia prolinfocítica de linfocitos B; linfoma de células pilosas; leucemia prolinfocítica de linfocitos T, linfoma linfoplasmocítico, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma esplénico de la zona marginal, plasmocitoma, una enfermedad por deposición de inmunoglobulina monoclonal, o una enfermedad de cadena pesada, linfoma de linfocitos B extranodal de la zona marginal (linfoma MALT), linfoma de linfocitos B nodal de la zona marginal (NMZL), linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de linfocitos B grandes y difusos, linfoma mediastínico (tímico) de linfocitos B grandes, linfoma intravascular de linfocitos B grandes, linfoma por efusión primaria, leucemia linfocítica granular de linfocitos T grandes, leucemia de linfocitos NK agresiva, linfoma de linfocitos NK/T extranodal, linfoma de linfocitos T de tipo enteropatía, linfoma de linfocitos T hepatoesplénicos, linfoma de linfocitos NK blásticos, micosis fungoide (síndrome de Sezary), un trastorno linfoproliferativo de linfocitos T CD30 positivos cutáneo primario, linfoma macrocítico anaplásico cutáneo primario, papulosis linfomatoide, linfoma de linfocitos T angioinmunoblástico, linfoma periférico de linfocitos T, linfoma macrocítico anaplásico, no especificado, un linfoma de Hodgkin, o un linfoma de Hodgkin con predominio de linfocitos nodulares.

20 En lo sucesivo en la presente memoria, la referencia a linfocitos citolíticos naturales dentro del contexto de la invención se debe entender como referencia a linfocitos citolíticos naturales que comprenden linfocitos PINK de la invención. de forma coherente con esto, en la presente memoria después de hacer referencia a linfocitos PINK dentro del contexto de la invención se debe entender que la referencia a linfocitos PINK como se ha definido anteriormente, también se refiere a linfocitos PINK de la invención.

25 En una realización, el método comprende adicionalmente la administración a dicho individuo de una cantidad eficaz de lenalidomida, pomalidomida, o talidomida. En una realización, dichos linfocitos citolíticos naturales aislados se han puesto en contacto con pomalidomida, lenalidomida, o talidomida antes de dicha administración.

En otra realización, los linfocitos citolíticos naturales aislados comprenden linfocitos citolíticos naturales no obtenidos a partir de perfundido de placenta.

30 La presente invención también proporciona linfocitos citolíticos naturales aislados que comprenden linfocitos PINK CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻ aislados para uso en un método para tratamiento de un individuo que tiene una infección vírica, en donde el método comprende la administración a dicho individuo dichos linfocitos citolíticos naturales aislados que comprenden linfocitos PINK aislados de la invención.

En una realización, el método comprende adicionalmente la administración a dicho individuo de una cantidad eficaz de lenalidomida, pomalidomida, o talidomida. En otra realización, los linfocitos citolíticos naturales aislados se han puesto en contacto con pomalidomida, lenalidomida, o talidomida antes de dicha administración.

35 En otra realización, los linfocitos citolíticos naturales aislados comprenden linfocitos citolíticos naturales no obtenidos a partir de perfundido de placenta.

40 Además, en una realización, los linfocitos citolíticos naturales aislados son linfocitos citolíticos naturales combinados que comprenden linfocitos citolíticos naturales aislados de perfundido de placenta y linfocitos citolíticos naturales aislados de sangre del cordón umbilical. En una realización específica, dicha sangre del cordón umbilical se aísla de la placenta a partir de la que se obtiene dicho perfundido de placenta.

En una realización específica, los linfocitos citolíticos naturales aislados son linfocitos citolíticos naturales combinados que comprenden: un número de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺CD16⁻ detectablemente más elevado que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica;

45 un número de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺CD16⁺ detectablemente menor que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica; un número detectablemente más elevado de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺KIR2DL2/L3⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica; un número detectablemente menor de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺NKp46⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica; un número detectablemente más elevado de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺NKp30⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica; un número detectablemente más elevado de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺2B4⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica; o un número detectablemente más elevado de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺CD94⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica.

55 En otra realización, los linfocitos citolíticos naturales aislados se ponen en contacto con dicha pomalidomida, lenalidomida, o talidomida en una cantidad durante un periodo de tiempo suficiente para que dichos linfocitos citolíticos naturales expresen de forma detectable más granzima B, o ARNm que codifica granzima B, que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales que no se ponen en contacto con dicha pomalidomida,

lenalidomida, o talidomida. En otra realización más, los linfocitos citolíticos naturales aislados para uso en la presente invención no se han cultivado antes de dicha administración.

En una realización específica, los linfocitos PINK expresan una o más de proteína aminopeptidasa N, proteína apolipoproteína E, proteína 1 de interacción con atrofina-1, proteína inxina inx-3, proteína precursora de integrina alfa-2, proteína precursora de integrina beta-5, proteína precursora de glicoproteína GP49B de superficie de mastocitos, o proteína del receptor 1 de rianodina; y en donde dichos linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta no expresan una o más de proteína precursora del receptor 4 del factor de crecimiento de fibroblastos, proteína similar al nucleótido 4 asociado a la inmunidad, proteína precursora de integrina alfa-L, proteína precursora de integrina de beta 2, proteína precursora de integrina de beta 4, proteína precursora de mureína transglicosilasa D lítica unida a membrana, proteína 8 relacionada con proteína de unión a oxisterol, o proteína del precursor 1 de perforina 1.

En la presente memoria se proporcionan linfocitos citolíticos naturales, que comprenden linfocitos citolíticos naturales ("PINK") obtenidos a partir de placenta obtenidos a partir de perfundido de placenta opcionalmente en combinación con un compuesto inmunomodulador, *p. ej.*, un compuesto inmunomodulador que se describe en la Sección 5.9, que sigue a continuación, o talidomida para uso en un método para tratar a un individuo que tiene cáncer, *p. ej.*, un cáncer hematológico o un tumor sólido, o una infección vírica, o para suprimir el crecimiento o proliferación de una célula tumoral o pluralidad de células tumorales. Los linfocitos citolíticos naturales se pueden obtener a partir de cualquier fuente, por ejemplo, pero no limitado a, placenta, sangre del cordón umbilical, sangre de placenta, sangre periférica, bazo, hígado. Los linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos PINK, pueden ser aún con ojos o heterólogos para un receptor (*p. ej.*, un individuo que tiene cáncer o una infección vírica), o pueden ser del mismo individuo o de un individuo diferente, al individuo que comprende células tumorales que se van a suprimir. En ciertas realizaciones, los linfocitos citolíticos naturales (NK) aislados a partir de perfundido de placenta, *p. ej.*, perfundido de placenta humana, o linfocitos NK que se han aislado a partir de tejido de placenta que se ha interrumpido por vía mecánica y/o por vía enzimática. Los métodos de uso del perfundido de placenta, células obtenidas a partir de perfundido de placenta o linfocitos citolíticos naturales obtenidos a partir de perfundido de placenta, *p. ej.*, intermedio linfocitos citolíticos naturales, para tratar individuos que tienen cáncer, *p. ej.*, un cáncer hematológico o un tumor sólido, o una infección vírica, o en la supresión de la proliferación de células tumorales, se describen en la Sección 5.1, que sigue a continuación. Los métodos para obtener perfundido de placenta, y obtener células de perfundido de placenta, se describen en la Sección 5.2, que sigue a continuación. Los métodos para obtener linfocitos citolíticos naturales de placenta mediante interrupción del tejido de placenta se describen en la Sección 5.3, que sigue a continuación. La interrupción del tejido de placenta se describe en la Sección 5.4, que sigue a continuación. Las características de los linfocitos citolíticos naturales de placenta se describen en la Sección 5.5, que sigue a continuación. Los linfocitos citolíticos naturales de placenta y cordón umbilical emparejados se describen en la Sección 5.6, que sigue a continuación. Las combinaciones de perfundido de placenta o células de perfundido de placenta y otras células, útiles en los métodos de tratamiento o supresión tumoral que se describen en la presente memoria, se describen en la Sección 5.7, que sigue a continuación. La conservación del perfundido de placenta y células de perfundido se describen en la Sección 5.8, que sigue a continuación. Los compuestos inmunomoduladores para uso en los métodos que se describen en la presente memoria se describen en la Sección 5.9, que sigue a continuación. La administración de las células útiles en los métodos que se describen en la presente memoria se describe en la Sección 5.10, que sigue a continuación.

5.1. Uso de Perfundido de Placenta o Linfocitos Citolíticos Naturales y Compuestos Inmunomoduladores en el Tratamiento de Cáncer o Infección Vírica y Supresión de Crecimiento de Células Tumorales

En un aspecto, la invención generalmente se refiere a la supresión del crecimiento, *p. ej.*, proliferación, de células tumorales que comprende poner en contacto las células tumorales con una cantidad eficaz de perfundido de placenta aislado, células de perfundido de placenta aislado, los linfocitos citolíticos naturales aislados, *p. ej.*, linfocitos citolíticos naturales de placenta, *p. ej.*, linfocitos citolíticos naturales intermedios obtenidos a partir de placenta, linfocitos citolíticos naturales combinados aislados, y/o combinaciones de los mismos. Las células tumorales pueden ser células tumorales *in vitro*, o pueden ser células tumorales *in vivo*, *p. ej.*, en un mamífero, *p. ej.*, un ser humano, que tiene cáncer, por ejemplo, un cáncer hematológico o tumor sólido.

La invención generalmente también se refiere al tratamiento de un individuo que tiene una deficiencia de linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.* una deficiencia en el número absoluto de linfocitos citolíticos naturales o una deficiencia en el número de linfocitos citolíticos naturales funcionales. En ciertas realizaciones, la deficiencia de linfocitos citolíticos naturales en el individuo está asociada con, o conduce a, una infección vírica, cáncer, *p. ej.*, un cáncer hematológico o un tumor sólido, en el individuo. La presencia de una infección vírica o cáncer en el individuo, sin embargo, puede estar relacionada o no con una deficiencia de los linfocitos citolíticos naturales del individuo. En una realización específica, dicha deficiencia de linfocitos citolíticos naturales surge a partir de una causa relacionada con dicho cáncer o infección vírica. En otra realización, dicha deficiencia de linfocitos citolíticos naturales surge de una causa no relacionada con dicho cáncer o infección vírica.

5.1.1. Tratamiento de Cánceres

En una realización, en la presente memoria se proporcionan linfocitos citolíticos naturales aislados que comprenden

linfocitos PINK CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻ aislados para uso en un método para tratar un individuo que tiene un cáncer, por ejemplo, un cáncer hematológico o un tumor sólido, p. ej., un individuo que tiene una deficiencia de linfocitos citolíticos naturales, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad eficaz de dichos linfocitos citolíticos naturales aislados, p. ej., linfocitos citolíticos naturales de placenta, p. ej., linfocitos citolíticos naturales intermedios obtenidos a partir de placenta, linfocitos citolíticos naturales combinados aislados, y/o combinaciones de los mismos. En una realización específica, el método comprende administrar adicionalmente a dicho individuo de una cantidad eficaz de un compuesto inmunomodulador, p. ej., un compuesto inmunomodulador que se describe en la Sección 5.9, que sigue a continuación, o talidomida, en donde dicha cantidad eficaz es una cantidad que, p. ej., da como resultado una mejora detectable de, disminución de la progresión de, o eliminación de, uno o más síntomas de un cáncer que padece el individuo.

De acuerdo con la presente invención, el cáncer es leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda de precursores B, leucemia linfoblástica aguda de precursores T, leucemia de Burkitt (linfoma de Burkitt), o leucemia bifenotípica aguda, leucemia monocítica crónica, leucemia linfocítica crónica (CLL)/linfoma linfocítica de células pequeñas, o leucemia prolinfocítica de linfocitos B; linfoma de células pilosas; leucemia prolinfocítica de linfocitos T; linfoma linfoplasmocítico (p. ej., macroglobulinemia de Waldenström), linfoma de la zona marginal esplénica, plasmocitoma, una enfermedad por deposición de inmunoglobulina monoclonal, o una enfermedad de cadena pesada), linfoma de linfocitos B extranodal de la zona marginal (linfoma MALT), linfoma de linfocitos B nodal de la zona marginal (NMZL), linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de linfocitos B grandes y difusos, linfoma mediastínico (tímico) de linfocitos B grandes, linfoma intravascular de linfocitos B grandes, linfoma por efusión primaria, leucemia linfocítica granular de linfocitos T grandes, leucemia de linfocitos NK agresiva, linfoma de linfocitos NK/T extranodal, linfoma de linfocitos T de tipo nasal, de tipo enteropatía, linfoma de linfocitos T hepatoesplénicos, linfoma de linfocitos NK blásticos, micosis fungoide (síndrome de Sezary), un trastorno linfoproliferativo de linfocitos T CD30 positivos cutáneo primario (p. ej., linfoma macrocítico anaplásico cutáneo primario o papulosis linfomatoide), linfoma de linfocitos T angioinmunoblástico, linfoma periférico de linfocitos T, linfoma macrocítico anaplásico, no especificado, un linfoma de Hodgkin o linfoma de Hodgkin con predominio de linfocitos nodulares. En otro aspecto de la descripción, el cáncer es mieloma múltiple o síndrome mielodisplásico.

En ciertas realizaciones, el individuo que tiene un cáncer, por ejemplo, un cáncer hematológico o un tumor sólido, p. ej., un individuo que tiene una deficiencia de linfocitos citolíticos naturales, es un individuo que ha recibido un trasplante de médula ósea antes de dicha administración. En ciertas realizaciones, el trasplante de médula ósea estaba en tratamiento de dicho cáncer. En otras ciertas realizaciones, el trasplante de médula ósea estaba en tratamiento de una afección distinta a dicho cáncer. En ciertas realizaciones, el individuo recibió un agente inmunosupresor además de dicho trasplante de médula ósea. En ciertas realizaciones, el individuo que se ha sometido a un trasplante de médula ósea presenta uno o más síntomas de enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) en el momento de dicha administración. En otras ciertas realizaciones, al individuo que se ha sometido a un trasplante de médula ósea se le administran dichas células antes de que se haya manifestado un síntoma de enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD).

En otras ciertas realizaciones, el individuo que tiene un cáncer, por ejemplo, un cáncer hematológico, ha recibido al menos una dosis de un inhibidor de TNF α , p. ej., ETANERCEPT® (Enbrel), antes de dicha administración. En realizaciones específicas, dicho individuo recibió dicha dosis de un inhibidor de TNF α dentro de los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses de diagnóstico de dicho cáncer. En una realización específica, el individuo que ha recibido una dosis de un inhibidor de TNF α presenta leucemia mieloide aguda. En una realización más específica, el individuo que ha recibido una dosis de un inhibidor de TNF α y presenta leucemia mieloide aguda presenta adicionalmente la delección de la rama larga del cromosoma 5 en células sanguíneas. En otra realización, el individuo que tiene un cáncer, por ejemplo, un cáncer hematológico, presenta un cromosoma Filadelfia.

En otras ciertas realizaciones, el cáncer, por ejemplo, un cáncer hematológico o un tumor sólido, en dicho individuo es resistente a uno o más fármacos contra el cáncer. En una realización específica, el cáncer es resistente al GLEEVEC® (mesilato de imatinib).

En ciertas realizaciones, el cáncer, por ejemplo, un cáncer hematológico, en dicho individuo responde a al menos un fármaco contra el cáncer; en esta realización, perfundido de placenta, células de perfundido de placenta aislado, los linfocitos citolíticos naturales aislados, p. ej., linfocitos citolíticos naturales de placenta, p. ej., linfocitos citolíticos naturales intermedios obtenidos a partir de placenta, linfocitos citolíticos naturales combinados aislados, y/o combinaciones de los mismos, y opcionalmente un compuesto inmunomodulador, se añaden como tratamientos auxiliares o como una terapia de combinación con dicho fármaco contra el cáncer. En otras ciertas realizaciones, el individuo que tiene un cáncer, por ejemplo, un cáncer hematológico, se trató con al menos un fármaco contra el cáncer, y tiene recaída, antes de dicha administración.

5.1.2. Tratamiento de Infección Vírica

En otra realización, en la presente memoria se proporcionan linfocitos citolíticos naturales que comprenden linfocitos

PINK CD56+, CD16-, CD3- para usar en un método para tratar un individuo que tiene una infección vírica, *p. ej.*, un individuo que tiene una deficiencia de linfocitos citolíticos naturales, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad eficaz de dichos linfocitos citolíticos naturales aislados, *p. ej.*, linfocitos citolíticos naturales de placenta, *p. ej.*, linfocitos citolíticos naturales intermedios obtenidos a partir de placenta, linfocitos citolíticos naturales combinados aislados, y/o combinaciones de los mismos, y opcionalmente un compuesto inmunomodulador, *p. ej.*, un compuesto inmunomodulador que se describe en la Sección 5.9, que sigue a continuación, o talidomida, en donde dicha cantidad es una cantidad que, *p. ej.*, da como resultado una mejora detectable de, disminución de la progresión de, o eliminación de, uno o más síntomas de dicha infección vírica. En realizaciones específicas, la infección vírica es una infección por un virus de la familia Adenoviridae, Picornaviridae, Herpesviridae, Hepadnaviridae, Flaviviridae, Retroviridae, Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Papillomaviridae, Rhabdoviridae, o Togaviridae. En realizaciones más específicas, dicho virus es virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus Coxsackie, virus de la hepatitis A (HAV), virus de la polio, virus Epstein-Barr (EBV), tipo 1 del herpes simplex (HSV1), tipo 2 del herpes simplex (HSV2), citomegalovirus humano (CMV), tipo 8 del virus del herpes humano (HHV8), virus del herpes zóster (virus de la varicela zóster (VZV) o virus Shingles), virus de la hepatitis B (HBV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la hepatitis D (HDV), virus de la hepatitis E (HEV), virus de la rete (*p. ej.*, virus de la gripe A virus, virus de la gripe B, virus de la gripe C, o togotovirus), virus del sarampión, y los de las paperas, virus de parainfluenza, virus del papiloma, virus de la rabia, o virus de la rubéola.

En otras realizaciones más específicas, dicho virus es la especie A de adenovirus, serotipo 12, 18, o 31; virus es la especie B de adenovirus, serotipo 3, 7, 11, 14, 16, 34, 35, o 50; virus es la especie C de adenovirus, serotipo 1, 2, 5 o 6; especie D, serotipo 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 51; especie E, serotipo 4; o especie F, serotipo 40 o 41.

En otras ciertas realizaciones más específicas, el virus es el virus Apoi (APOIV), virus Aroa (AROAV), virus bagaza (BAGV), virus Banzi (BANV), virus Bouboui (BOUV), virus Cacipacore (CPCV), virus Carey Island (CIV), virus Cowbone Ridge (CRV), virus del Dengue (DENV), virus Edge Hill (EHV), virus Gadgets Gully (GGYV), virus Ilheus (ILHV), virus de la meningoencefalomielitis del pavo de Israel (ITV), virus de la encefalitis japonesa (JEV), virus Jugra (JUGV), virus Jutiapa (JUTV), virus kadam (KADV), virus Kedougou (KEDV), virus Kokobera (KOKV), virus Koutango (KOUV), virus de la enfermedad del Bosque de Kyasanur (KFDV) virus Langat (LGTV), virus Meaban (MEAV), virus Modoc (MODV), virus leucoencefalitis de Montana myotis (MMLV), virus de la encefalitis de Murray Valley (MVEV), virus Ntaya (NTAV), virus de la fiebre hemorrágica de Omsk (OHFV), virus Powassan (POWV), virus del Río Bravo (RBV), virus Royal Farm (RFV), virus Saboya (SABV), virus de la encefalitis de St. Louis (SLEV), virus Sal Vieja (SVV), virus San Perlita (SPV), virus Saumarez Reef (SREV), virus Sepik (SEPV), virus Tembusu (TMUV), virus de la encefalitis transmitida por garrapata (TBEV), virus Tyuleniy (TYUV), virus Uganda S (UGSV), virus Usutu (USUV), virus Wesselsbron (WESSV), virus del Nilo occidental (WNV), virus Yaounde (YAOV), virus de la fiebre amarilla (YFV), virus Yokose (YOKV), o virus Zika (ZIKV).

5.1.3. Supresión de Proliferación de Células TumORAles

Además, el método de tratamiento de cáncer que se ha mencionado anteriormente comprende la supresión de la proliferación de células tumorales, después de poner en contacto las células tumorales con linfocitos citolíticos naturales aislados, que comprenden CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻ aislados, linfocitos citolíticos naturales PINK intermedios obtenidos a partir de placenta, linfocitos citolíticos naturales combinados aislados, y/o combinaciones de los mismos. En una realización específica, las células tumorales se ponen en contacto adicionalmente con un compuesto inmunomodulador, *p. ej.*, un compuesto inmunomodulador que se describe en la Sección 5.9, que sigue a continuación, o talidomida, de modo que la proliferación de las células tumorales esta detectable mente reducida en comparación con respecto a células tumorales del mismo tipo que no se ponen en contacto con los c linfocitos citolíticos naturales aislados, que comprenden CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻ aislados, linfocitos citolíticos naturales intermedios obtenidos a partir de placenta, linfocitos citolíticos naturales combinados aislados, y/o combinaciones de los mismos. En otro aspecto específico, dichos linfocitos citolíticos naturales no son linfocitos citolíticos naturales de placenta, *p. ej.*, no son linfocitos PINK.

Como se usa en la presente memoria, "poner en contacto", con respecto a células, en una realización incluye contacto físico directo, *p. ej.*, de célula a célula, contacto entre linfocitos citolíticos naturales, que comprenden dichos linfocitos citolíticos naturales intermedios, y/o linfocitos citolíticos naturales combinados aislados y células tumorales. En otra realización, "poner en contacto" incluye la presencia en el mismo espacio físico, *p. ej.*, linfocitos citolíticos naturales que comprenden dichos linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta, y/o linfocitos citolíticos naturales combinados aislados se colocan en el mismo recipiente *p. ej.*, placa de cultivo, placa de múltiples pocillos) como células tumorales. En otra realización, la "puesta en contacto" linfocitos citolíticos naturales combinados o linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta, y células tumorales se consigue, *p. ej.*, mediante inyección o infusión de los linfocitos citolíticos naturales combinados o linfocitos citolíticos naturales que comprenden dichos linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta en un individuo, *p. ej.*, un ser humano que contiene células tumorales, *p. ej.*, un paciente con cáncer. "Poner en contacto", en el contexto de compuestos inmunomoduladores y/o talidomida, se refiere a, *p. ej.*, que las células y el compuesto inmunomodulador y/o talidomida se ponen en contacto directamente por vía física entre sí, o se colocan dentro del mismo volumen físico (*p. ej.*, un recipiente de cultivo celular o un individuo).

En ciertos aspectos de la descripción, el perfundido de placenta se usa en cualquier cantidad que de como resultado un beneficio terapéutico detectable a un individuo que contiene células tumorales, *p. ej.*, un paciente con cáncer. En otras ciertas realizaciones, los linfocitos citolíticos naturales que comprenden dichos linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta, y/o linfocitos citolíticos naturales combinados, o combinaciones de los mismos, se usan en cualquier cantidad que de como resultado un beneficio terapéutico detectable a un individuo que contiene células tumorales. Por lo tanto, en otra realización, en la presente memoria se proporciona un método para suprimir la proliferación de células tumorales que comprende poner en contacto las células tumorales con linfocitos citolíticos naturales que comprenden dichos linfocitos citolíticos naturales intermedios obtenidos a partir de placenta, dentro de un individuo de modo que dicha puesta en contacto es terapéuticamente beneficiosa de forma detectable o demostrable para dicho individuo. En una realización específica, el método comprende adicionalmente poner en contacto las células tumorales con un compuesto inmunomodulador, *p. ej.*, un compuesto inmunomodulador que se describe en la Sección 5.9, que sigue a continuación, o talidomida, de modo que dicha puesta en contacto es terapéuticamente beneficiosa de forma detectable o demostrable para dicho individuo.

En un aspecto específico de la divulgación, las células tumorales son células de cáncer hematológico. En diversas realizaciones específicas, las células tumorales are células de carcinoma ductal primario, células de leucemia, células de leucemia de linfocitos T aguda, células de linfoma mielóide crónico (CML), células de leucemia mielógena aguda, células de leucemia mielógena crónica (CML), células de carcinoma de pulmón, células de adenocarcinoma de colon, células de linfoma histiocítico, célula de mieloma múltiple, células de retinoblastoma, células de carcinoma colorrectal o adenocélulas de carcinoma colorrectal. En otras realizaciones específicas, las células tumorales pueden ser células de cualquiera de los tipos de cáncer o tumor que se han descrito en la Sección 5.1.1, que se ha mencionado anteriormente.

Como se usa en la presente memoria, "terapéuticamente beneficioso" y "beneficios terapéuticos" incluyen, pero no se limitan a, *p. ej.*, reducción del tamaño de un tumor; disminución o cese de la expansión de un tumor; reducción del número de células cancerosas en una muestra de tejido, *p. ej.*, una muestra de sangre, por unidad de volumen; la mejora clínica de cualquier síntoma del cáncer o tumor en particular que tiene dicho individuo, la disminución o cese del empeoramiento de cualquier síntoma del cáncer en particular que tiene el individuo, *etc.* se dice que la puesta en contacto de perfundido de placenta, células de perfundido de placenta y/o linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos PINK con células tumorales, opcionalmente con un compuesto inmunomodulador, *p. ej.*, un compuesto inmunomodulador que se ha descrito en la Sección 5.9, que se ha mencionado anteriormente, o talidomida, que consigue uno cualquiera algo más de tales beneficios terapéuticos, es terapéuticamente beneficioso.

5.1.4. Administración

La determinación del número de células, *p. ej.*, células de perfundido de placenta, *p. ej.*, células nucleadas de perfundido de placenta, linfocitos citolíticos naturales combinados, y/o linfocitos citolíticos naturales aislados, *p. ej.*, linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta, y determinación de la cantidad de un compuesto inmunomodulador, *p. ej.*, un compuesto inmunomodulador en la Sección 5.9, que sigue a continuación, o talidomida, se puede determinar independientemente entre sí.

5.1.4.1. Administración de Células

En ciertas realizaciones, los linfocitos citolíticos naturales combinados, y/o linfocitos citolíticos naturales aislados que comprenden linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta (PINK) CD56⁺CD16⁻CD3⁻, se usan, *p. ej.*, se administran a un individuo, en cualquier candidato número que dé como resultado un beneficio terapéuticamente detectable al individuo, *p. ej.*, una cantidad eficaz, en donde el individuo tiene una infección vírica, cáncer, o células tumorales, por ejemplo, un individuo que tiene células tumorales, un tumor sólido o un cáncer hematológico, *p. ej.*, un paciente con cáncer. Las células de este tipo se pueden administrar a un individuo mediante números absolutos de células, *p. ej.*, a dicho individuo se le pueden administrar aproximadamente, al menos aproximadamente, o como máximo aproximadamente, 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} , o 1×10^{11} linfocitos citolíticos naturales combinados y/o linfocitos citolíticos naturales que comprenden dichos linfocitos PINK. En otras realizaciones, los linfocitos citolíticos naturales combinados, y/o linfocitos citolíticos naturales aislados que comprenden linfocitos citolíticos naturales intermedios de a partir de placenta CD56⁺CD16⁻CD3⁻, se pueden administrar a tal individuo, *p. ej.*, a dicho individuo se le pueden administrar aproximadamente, al menos aproximadamente, o como máximo aproximadamente, 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} , o 1×10^{11} linfocitos citolíticos naturales combinados, y/o linfocitos citolíticos naturales por kilogramo del individuo. Las células de perfundido de placenta y/o linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos citolíticos naturales intermedios obtenidos a partir de placenta se pueden administrar a tal individuo según una proporción aproximada entre un número de células de perfundido de placenta y/o linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta, y un número de células tumorales en dicho individuo. Por ejemplo, células de perfundido de placenta y/o linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta, se pueden administrar a dicho individuo en una proporción de aproximadamente, al menos aproximadamente o como máximo aproximadamente 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 con respecto al número de células tumorales en el individuo. El número de células tumorales en tal individuo se puede calcular, *p. ej.*, haciendo el recuento del número de células tumorales en una muestra de tejido

del individuo, *p. ej.*, muestra de sangre, biopsia, o similares. En realizaciones específicas, *p. ej.*, para tumores sólidos, dicho recuento se realiza en combinación con formación imágenes del tumor o tumores para obtener un volumen del tumor aproximado. En una realización específica, un compuesto inmunomodulador o talidomida, *p. ej.*, una cantidad eficaz de un compuesto inmunomodulador o talidomida, se administran al individuo.

- 5 En ciertas realizaciones, el método para tratamiento de cáncer o tratamiento de infección vírica que se ha mencionado anteriormente comprende suprimir la proliferación de células tumorales, *p. ej.*, en un individuo; tratamiento del individuo que tiene una deficiencia en los linfocitos citolíticos naturales del individuo; o tratamiento de un individuo que tiene una infección vírica; o tratamiento de un individuo que tiene cáncer, *p. ej.*, un individuo que tiene células tumorales, un cáncer hematológico o un tumor sólido, comprende poner en contacto las células tumorales, o administrar a dicho individuo, una combinación de linfocitos citolíticos naturales combinados, y/o linfocitos citolíticos naturales aislados que comprenden linfocitos citolíticos naturales intermedios obtenidos a partir de placenta CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻ aislados. En realizaciones específicas, el método comprende adicionalmente poner en contacto las células tumorales, o administrar al individuo, un compuesto inmunomodulador o talidomida. Por ejemplo, en diversas realizaciones, el método que se ha descrito anteriormente comprende suprimir la proliferación de células tumorales, o tratar un individuo que tiene cáncer o una infección vírica, o un individuo que tiene una deficiencia en los linfocitos NK del individuo, que comprende poner en contacto dichas células tumorales con, o administrar a dicho individuo, una cantidad eficaz de linfocitos NK aislados, que comprende dichos linfocitos PINK; linfocitos NK aislados, que comprenden dichos linfocitos PINK, y linfocitos citolíticos naturales combinados. En una realización específica, los métodos que se han mencionado anteriormente comprenden adicionalmente poner en contacto las células tumorales con, o administrar a dicho individuo, un compuesto inmunomodulador o talidomida,

- En una realización específica, por ejemplo, el tratamiento de un individuo que tiene una deficiencia en los linfocitos citolíticos naturales del individuo; o tratamiento de un individuo que tiene un cáncer o una infección vírica, o supresión de la proliferación de células tumorales comprende poner en contacto dichas células tumorales, o administrar a dicho individuo, linfocitos citolíticos naturales combinados y/o una pluralidad de linfocitos NK, que comprenden CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻. En algunos casos, por ejemplo, cada mililitro de perfundido de placenta se suplementa con aproximadamente 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} o más células de perfundido de placenta o linfocitos citolíticos naturales aislados, *p. ej.*, linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta. En otros ejemplos, perfundido de placenta, *p. ej.*, una unidad (*es decir*, la recogida de una sola placenta), o aproximadamente 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 ml de perfundido, se suplementa con aproximadamente 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 linfocitos NK aislados, linfocitos citolíticos naturales combinados, y/o células de perfundido de placenta aislado 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} humanas linfocitos NK aislados, linfocitos citolíticos naturales combinados, y/o células de perfundido de placenta aislado. En otra realización específica, el método comprende adicionalmente poner en contacto las células tumorales con, o administrar al individuo, un compuesto inmunomodulador, o talidomida.

- En otra realización específica, el tratamiento de un individuo que tiene una deficiencia en los linfocitos citolíticos naturales del individuo; o tratamiento de un individuo que tiene un cáncer o una infección vírica, o supresión de la proliferación de células tumorales comprende pone en contacto las células tumorales, o administrar al individuo, linfocitos citolíticos naturales combinados, y/o linfocitos NK aislados que comprenden linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻. Por ejemplo, aproximadamente 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 more células de perfundido de placenta aislado 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 de perfundido de placenta aislado, se suplementan con aproximadamente, o al menos aproximadamente, 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 linfocitos NK aislados, *p. ej.*, linfocitos PINK, y/o linfocitos citolíticos naturales combinados 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 linfocitos NK aislados, *p. ej.*, linfocitos PINK. En otras realizaciones más específicas, aproximadamente 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 linfocitos PINK dichos linfocitos PINK y/o linfocitos citolíticos naturales combinados 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 linfocitos NK aislados y/o linfocitos citolíticos naturales combinados se suplementan con aproximadamente, o al menos aproximadamente, 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 de perfundido, o aproximadamente 1 unidad de perfundido. En otra realización específica, el método comprende adicionalmente poner en contacto las células tumorales con, o administrar al individuo, un compuesto inmunomodulador, o talidomida.

- En otra realización específica, el tratamiento de un individuo que tiene una deficiencia en los linfocitos citolíticos naturales del individuo; tratamiento de un individuo que tiene cáncer; tratamiento de un individuo que tiene una infección vírica; o supresión de la proliferación de células tumorales, comprende poner en contacto las células tumorales, o administrar al individuo, los linfocitos citolíticos naturales aislados que comprenden linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻, suplementados con perfundido de placenta, células de perfundido de placenta aislado, y/o linfocitos citolíticos naturales combinados. En realizaciones más específicas, aproximadamente 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 ,

5 1 x 10¹⁰, 5 x 10¹⁰, 1 x 10¹¹ o más linfocitos citolíticos naturales aislados que comprenden dichos linfocitos PINK, se suplementan con aproximadamente 1 x 10⁴, 5 x 10⁴, 1 x 10⁵, 5 x 10⁵, 1 x 10⁶, 5 x 10⁶, 1 x 10⁷, 5 x 10⁷, 1 x 10⁸, 5 x 10⁸ o más linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos PINK, y/o linfocitos citolíticos naturales combinados por mililitro, o 1 x 10⁴, 5 x 10⁴, 1 x 10⁵, 5 x 10⁵, 1 x 10⁶, 5 x 10⁶, 1 x 10⁷, 5 x 10⁷, 1 x 10⁸, 5 x 10⁸, 1 x 10⁹, 5 x 10⁹, 1 x 10¹⁰, 5 x 10¹⁰, 1 x 10¹¹ o más células de perfundido de placenta y/o linfocitos citolíticos naturales combinados. En otras organizaciones más específicas, 1 x 10⁴, 5 x 10⁴, 1 x 10⁵, 5 x 10⁵, 1 x 10⁶, 5 x 10⁶, 1 x 10⁷, 5 x 10⁷, 1 x 10⁸, 5 x 10⁸, 1 x 10⁹, 5 x 10⁹, 1 x 10¹⁰, 5 x 10¹⁰, 1 x 10¹¹ o más linfocitos NK aislados que comprenden dichos linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta, y/o linfocitos citolíticos naturales combinados se suplementan con aproximadamente, o al menos aproximadamente, 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 de perfundido, o aproximadamente 1 unidad de perfundido. En otra realización específica, el método además comprende poner en contacto las células tumorales, o administrar al individuo un compuesto inmunomodulador o talidomida.

15 En otra realización específica, el tratamiento de un individuo que tiene una deficiencia en los linfocitos citolíticos naturales del individuo; tratamiento de un individuo que tiene cáncer; tratamiento de un individuo que tiene una infección vírica; o supresión de la proliferación de células tumorales, comprende poner en contacto las células tumorales, o administrar al individuo, los linfocitos citolíticos naturales aislados que comprenden linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻; suplementados con perfundido de placenta, células de perfundido de placenta aislado, y/o linfocitos citolíticos naturales combinados, en donde dichas células se suplementan con células de placenta adherentes, *p. ej.*, células madres de placenta adherentes o células multipotentes. En realizaciones específicas, el perfundido de placenta, las células de perfundido, y/o linfocitos PINK se suplementan con aproximadamente 1 x 10⁴, 5 x 10⁴, 1 x 10⁵, 5 x 10⁵, 1 x 10⁶, 5 x 10⁶, 1 x 10⁷, 5 x 10⁷, 1 x 10⁸, 5 x 10⁸ o más células madre placenta adherentes por mililitro, o 1 x 10⁴, 5 x 10⁴, 1 x 10⁵, 5 x 10⁵, 1 x 10⁶, 5 x 10⁶, 1 x 10⁷, 5 x 10⁷, 1 x 10⁸, 5 x 10⁸, 1 x 10⁹, 5 x 10⁹, 1 x 10¹⁰, 5 x 10¹⁰, 1 x 10¹¹ o más células de placenta adherentes, *p. ej.*, células madre placenta adherentes o células multipotentes. En otra realización específica, el tratamiento de un individuo que tiene una deficiencia en los linfocitos citolíticos naturales del individuo; tratamiento de un individuo que tiene cáncer; tratamiento de un individuo que tiene una infección vírica; o supresión de la proliferación de células tumorales, se realiza usando un compuesto inmunomodulador o talidomida en combinación con linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta, suplementados con perfundido de placenta, células de perfundido de placenta aislado, y/o linfocitos citolíticos naturales combinados, en donde dichas células se suplementan con medio acondicionado con células 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 de perfundido, células de perfundido, linfocitos citolíticos naturales combinados, y/o linfocitos PINK, o por 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰, o 10¹¹ células. En ciertas realizaciones, las células de placenta adherentes son las células de placenta adherentes multipotentes que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.468.276 y en la Publicación de Solicitud de patentes de Estados Unidos N.º 2007/0275362 (documento de Patente de Estados Unidos N.º 8.057.788). En otra realización específica, el método comprende adicionalmente poner en contacto las células tumorales, o administrará el individuo, un compuesto inmunomodulador o talidomida.

40 En otras realizaciones, los linfocitos citolíticos naturales que comprenden linfocitos PINK CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻; linfocitos citolíticos naturales combinados, y combinaciones y agrupamientos que comprenden los mismos, se usan tal como se obtienen inicialmente, es decir, linfocitos citolíticos naturales combinados a partir de dicho perfundido y sangre del cordón umbilical emparejados, o linfocitos PINK aislados de tal perfundido o tales células de perfundido de placenta. En otras realizaciones, los linfocitos citolíticos naturales que comprenden dichos linfocitos PINK, y combinaciones y agrupamientos de los mismos se procesan antes de su uso. Por ejemplo, el perfundido de placenta se puede usar en su forma sin procesar a como se recoge de la placenta. El perfundido de placenta también se puede procesar antes de su uso, *p. ej.*, mediante selección negativa de uno o más tipos de células, reducción del volumen mediante deshidratación; liofilización y rehidratación, *etc.* De forma análoga, las poblaciones de células de perfundido se pueden usar tal como se aíslan inicialmente a partir de perfundido de placenta, *p. ej.*, como células nucleadas totales de perfundido de placenta, o se pueden procesar, *p. ej.*, para retirar uno o más tipos de células (*p. ej.*, eritrocitos). Los linfocitos citolíticos naturales pueden usar tal como se aíslan inicialmente a partir de una fuente de tejido; *p. ej.*, los linfocitos PINK se pueden usar tal como se aíslan inicialmente a partir de perfundido de placenta, por ejemplo, usando microperlas de CD56, o se pueden procesar, *p. ej.*, para retirar uno o más tipos de linfocitos no citolíticos.

55 En otro aspecto de la descripción, el tratamiento de un individuo que tiene una deficiencia en los linfocitos citolíticos naturales del individuo; tratamiento de un individuo que tiene cáncer; tratamiento de un individuo que tiene la infección vírica; o supresión de la proliferación de células tumorales, usando linfocitos citolíticos naturales que comprenden linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻; suplementados con perfundido de placenta, células de perfundido de placenta aislado, y/o linfocitos citolíticos naturales combinados, o agrupamientos o combinaciones que comprenden los mismos, comprende adicionalmente poner en contacto dichas células o perfundido con interleuquina-2 (IL-2) durante un periodo de tiempo antes de dicha puesta en contacto. En ciertas realizaciones, dicho periodo de tiempo es aproximadamente, 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 horas antes de dicho contacto.

Los linfocitos citolíticos naturales que comprenden dichos linfocitos PINK, linfocitos citolíticos naturales combinados,

o agrupaciones y/o combinaciones de los mismos, y opcionalmente compuesto inmunomodulador o talidomida, se pueden administrar una vez a un individuo que tiene una infección vírica, un individuo que tiene cáncer, o un individuo que tiene células tumorales durante el transcurso de terapia contra el cáncer; o se pueden administrar múltiples 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. En realizaciones en las que se usan células y un compuesto inmunomodulador o talidomida, el compuesto inmunomodulador o talidomida, y células, se pueden administrar al individuo en conjunto, *p. ej.*, en la misma formulación; por separado, *p. ej.*, en formulaciones separadas, aproximadamente al mismo tiempo; o se pueden administrar por separado, *p. ej.*, en diferentes programas de dosificación o en diferentes momentos del día. Los linfocitos citolíticos naturales que comprenden dichos linfocitos se pueden administrar sin tener en cuenta si el perfundido, células de perfundido, linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos PINK, agrupaciones y/o combinaciones de los mismos se han administrado al individuo en el pasado. Por lo tanto, los métodos que se proporcionan en la presente memoria incluyen la administración a una persona que tiene una infección vírica, que tiene cáncer, o que tiene células tumorales, cualquier combinación de linfocitos citolíticos naturales que comprenden dichos linfocitos PINK.

El perfundido de placenta, células de perfundido, linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos PINK, linfocitos citolíticos naturales combinados, agrupaciones, y/o combinaciones que comprenden los mismos, y opcionalmente compuesto inmunomodulador o talidomida, pueden ser parte de un régimen de terapia contra el cáncer que incluye uno u otros agentes contra el cáncer más. Los agentes contra el cáncer de ese tipo se conocen bien en la técnica. Los agentes contra el cáncer específicos que se pueden administrar a un individuo que tiene cáncer, *p. ej.*, un individuo que tiene células tumorales, además del perfundido, células de perfundido, linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos PINK, agrupaciones y/o combinaciones de los mismos, y opcionalmente compuesto inmunomodulador o talidomida, incluyen, pero no se limitan a: acivicina; aclarrubicina; hidrocloreto de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleuquina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; amsacrina; anastrozol; antramina; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; hidrocloreto de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar de sodio; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; hidrocloreto de carrubicina; carzelesina; cedefingol; celecoxib (inhibidor de COX-2); clorambucilo; cirlemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; hidrocloreto de daunorrubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziquona; docetaxel; doxorubicina; hidrocloreto de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; hidrocloreto de eflomitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; hidrocloreto de epirubicina; erbulozol; hidrocloreto de esorubicina; estramustina; fosfato de estramustina de sodio; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; hidrocloreto de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flucitabina; fosquidona; fostriecina de sodio; gemcitabina; hidrocloreto de gemcitabina; hidroxiurea; hidrocloreto de idarrubicina; ifosfamida; ilmofosina; iroplatin; irinotecán; hidrocloreto de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; hidrocloreto de liarozol; lometrexol de sodio; lomustina; hidrocloreto de losoxantrona; masoprocol; maitansina; hidrocloreto de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato de sodio; metoprina; meturedopa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; hidrocloreto de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamina; omaplatino; oxisurán; paclitaxel; pegaspargasa; peliomina; pentamustina; sulfato de peplomina; perfosfamida; pipobromano; piposulfano; hidrocloreto de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero de sodio; porfiromicina; prednimustina; hidrocloreto de procarbazona; puomicina; hidrocloreto de puomicina; pirazofurina; riboprina; safingol; hidrocloreto de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato de sodio; esparomicina; hidrocloreto de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalán de sodio; taxotere; tegafur; hidrocloreto de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; hidrocloreto de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vaporetida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; de vinglicinato sulfato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; e hidrocloreto de zorrubicina.

Otros fármacos contra el cáncer incluyen, pero sin limitación: 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etniluracilo; abiraterona; aclarrubicina; acilfulveno; adicipenol; adozelesina; aldesleuquina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; yrografolida; inhibidores de angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína 1 morfogenética anti-dorsalizante; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplaston; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores del gen de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfostina C; derivados de camptotecina; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRestM3; CARN 700; inhibidora obtenido a partir de cartílago; carzelesina; inhibidores de caseína quinasa (ICOS); castanoespermina; cecropina B; cetorelix; cloros;

cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidenmina B; deslorelina; dexamehasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamilo; diaziquna; didemina B; didox; dietilnoespermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; difenil espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxifluridina; doxorubicina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebseleno; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógeno; antagonistas de estrógeno; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; hidrocloreto de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; gadolinio texafirina; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de la gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfam; herregulina; bisacetamida de hexametileno; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imatinib (*p. ej.*, GLEEVEC®), imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor del factor 1 de crecimiento similar de tipo insulínico; agonistas de interferón; interferones; interleuquinas; iobenguano; yododoxorubicina; ipomeanol, 4-; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplakinolida; kahalalida F; triacetato de lamelarina-N; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinano; leptostatina; letrozol; factor de inhibición de leucemia; interferón alfa de leucocitos; leuprolida + estrógeno + progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipófilo; compuestos lipofílicos de platino; lissoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecán; lutecio texafirina; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspina; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteína de matriz; menogarilo; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; factor de crecimiento de fibroblastos de mitoxina-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; Erbitux, gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A+ pared celular de miobacteria sk; mopidamol; agente contra el cáncer de mostaza; micaperóxido B; extracto micobacteriano de la pared celular; miriaporona; N-acetilindolizina; benzamidas N-sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona + pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridróico; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; antioxidante de nitrógeno; nitrulina; oblimersen (GENA-SENSE®); O⁶-bencilguanina; octreotida; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracina; inductor oral de citoquinas; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrrizoxina; ácido pamidróico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazelitina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato de pentosano de sodio; pentostatina; pentozol; perflubrón; perfosfamida; alcohol perillíco; fenazinomina; fenilacetato; inhibidores de fosfatasa; picibanilo; hidrocloreto de pilocarpina; pirarrubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor de activador de plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfímero de sodio; porfiromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores de proteasoma; modulador inmune basado en la proteína A; inhibidor de la proteína quinasa C; inhibidores de proteína quinasa C, microalgas; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polioxietileno hemoglobina piridoxilado; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de la farnesil proteína transferasa ras; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida; rohituquina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxilo; safingol; saintopina; SarCNU; sarcositol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de la senescencia; oligonucleótidos sentido; inhibidores de transducción de señales; sizofirano; sobuzoxano; borocaptato de sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiestatina 1; escualamina; estipiamicina; inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonista de péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; talimustina; metyoduro de tamoxifeno; tauromustina; tazaroteno; tecogalán de sodio; tegafur; telurapirilio; inhibidores de telomerasa; temoporfina; tenipóxido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoietina; mimético de trombopoietina; timalfasina; agonista del receptor de timopoietina; timotrinano; hormona estimulante de tiroides; etil etiopurpurinas de estaño; tirapazamina; dicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; tricribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetrón; turosterida; inhibidores de tirosina quinasa; tirstofinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de uroquinasa; vapreotida; variolina B; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y zinostatina estimalamer.

En otra realización, los linfocitos citolíticos naturales, que comprenden linfocitos PINK CD56⁺, CD16⁺, CD3⁺, linfocitos citolíticos naturales combinados, y opcionalmente compuesto inmunomodulador o talidomida, se pueden administrar a un individuo que tiene una infección vírica como parte de un régimen de terapia antiviral que incluye uno o más agentes antivirales. Los agentes antivirales específicos que se pueden administrar a un individuo que tiene cáncer, además de los linfocitos citolíticos naturales que comprenden dichos linfocitos PINK, o combinaciones de linfocitos citolíticos naturales, incluyen, pero no se limitan a: imiquimod, podofilox, podofilina, interferón alfa (IFN α), reticolos, nonoxinol-9, aciclovir, famciclovir, valaciclovir, ganciclovir, cidofovir, amantadina, rimantadina, ribavirina, zanamavir y oseltaumavir; inhibidores de proteasa tales como indinavir, nelfinavir, ritonavir, o saquinavir; inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósidos tales como didanosina, lamivudina, estavudina, zalcitabina, o zidovudina; e inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos tales como nevirapina, o efavirenz.

5.2. Aislamiento de Linfocitos Citolíticos Naturales

- En la técnica se conocen métodos para aislar linfocitos citolíticos naturales. Los linfocitos citolíticos naturales se pueden aislar a enriquecer mediante tinción de células de una fuente de tejido, p. ej., sangre periférica, con anticuerpos para CD56 y CD5, y seleccionar células CD56⁺CD5⁻. Los linfocitos citolíticos naturales se pueden aislar usando un kit, por ejemplo disponible en el mercado, el Kit de Aislamiento de Linfocitos NK (Miltenyi Biotec). Los linfocitos citolíticos naturales también se pueden aislar a enriquecer mediante retirada de linfocitos citolíticos no naturales en una población de células que comprenden los linfocitos citolíticos naturales. Por ejemplo, los linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica se pueden aislar o enriquecer por agotamiento de linfocitos T, linfocitos B, monocitos, células dendríticas, plaquetas, granulocitos y eritrocitos de la sangre periférica usando, p. ej., anticuerpos para cada una de las poblaciones celulares que se van a excluir de los linfocitos citolíticos naturales aislados o enriquecidos. En ciertas realizaciones, los anticuerpos comprenden anticuerpos para CD3, CD14, CD36, CDw123, Clase II de HLA DR, DP y CD235a (glicoforina A). El aislamiento negativo se puede realizar usando un kit disponible en el mercado, p. ej., el Kit de Aislamiento Negativo de Linfocitos NK (DynaL Biotech). Las células aisladas con estos métodos se pueden clasificar adicionalmente, p. ej., para separar células CD16⁺ y CD16⁻.
- A continuación se describen métodos específicos para aislar linfocitos citolíticos naturales de placenta.

5.3. Perfundido de Placenta

5.3.1. Composición de la Recogida Celular

- Los linfocitos citolíticos naturales obtenidos a partir de perfundido de placenta, útiles en supresión tumoral o en el tratamiento de un individuo que tiene células tumorales, cáncer o una infección vírica, como se proporciona en la presente memoria, se pueden recoger mediante perfusión de un mamífero, p. ej., placenta post-parto humana usando una composición de recogida de células de placenta. El perfundido se puede recoger de la placenta mediante perfusión de la placenta con cualquier solución fisiológicamente aceptables, p. ej., una solución salina, medio de cultivo, o una composición de recogida de células más compleja. Una composición de recogida de células adecuada para la perfusión de una placenta, y para la recogida y conservación de células de perfundido, p. ej., células de perfundido de placenta nucleadas totales o linfocitos PINK, se describe con detalle en la Publicación de Solicitud de Estados Unidos relacionada N.º 2007/0190042-, (documento de Patente de Estados Unidos N.º 2007/0190042)

- La composición de recogida celular puede comprender cualquier solución fisiológicamente aceptable adecuada para la recogida y/o cultivo de células madre, por ejemplo, una solución salina (p. ej., solución salina tamponada con 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 similares.

- La composición de recogida celular puede comprender una o más componentes que tienden a conservar células de placenta, es decir, evitar que las células de placenta mueran, o retrasar la muerte de las células de placenta, reducir el número de células de placenta en una población de células que mueren, o similares, desde el momento de la recogida hasta el momento del cultivo. Los componentes de ese tipo pueden ser, p. ej., un inhibidor de la apoptosis (p. ej., un inhibidor de caspasa o inhibidor de JNK); un vasodilatador (p. ej., sulfato de magnesio, un fármaco antihipertensor, péptido natriurético Auricular (ANP), adrenocorticotropina, hormona liberadora de corticotropina, nitroprusiato 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 portador de oxígeno (p. ej., bromuro de perfluorooctilo, bromuro de perfluorodecilo, etc.).

- La composición de recogida celular puede comprender una o más enzimas degradantes de tejido, p. ej., una metaloproteasa, una serina proteasa, una proteasa neutra, una hialuronidasa, una Rnasa, o una DNasa, o similares. Las enzimas de ese tipo incluyen, pero 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 similares.

- La composición de recogida celular puede comprender una cantidad bacteriocida o bacteriostáticamente eficaz de un antibiótico. En ciertas realizaciones no limitantes, el antibiótico es un macrólido (p. ej., tobramicina), una cefalosporina (p. ej., cefalexina, cefradina, cefuroxima, cefprozilo, cefaclor, cefixima o cefadroxilo), una claritromicina, una eritromicina, una penicilina (p. ej., penicilina V) o una quinolona (p. ej., ofloxacina, ciprofloxacina o norfloxacina), una tetraciclina, una estreptomina, etc. En una realización particular, el antibiótico es activo contra bacterias Gram(+) y/o Gram(-), p. ej., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y similares.

- La composición de recogida celular también puede comprender una o más de los siguientes compuestos: adenosina (de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM); D-glucosa (de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM); iones magnesio (de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM); una macromolécula de peso molecular mayor que 20.000 daltons, en una realización, presente en una cantidad suficiente como para mantener la integridad endotelial y la viabilidad celular (p. ej., un coloide sintético o de origen natural, un polisacárido tal como dextrano o un polietilenglicol presente de aproximadamente 25 g/l a aproximadamente 100 g/l, o de aproximadamente 40 g/l a aproximadamente 60 g/l); un antioxidante (p. ej.,

hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, glutatión, vitamina C o vitamina E presente de aproximadamente 25 µM a aproximadamente 100 µM); un agente reductor (*p. ej.*, N-acetilcisteína presente de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 5 mM); una gente que evita el calcio entre en las células (*p. ej.*, verapamilo presente en de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 25 µM); nitroglicerina (*p. ej.*, de aproximadamente 0,05 g/l a aproximadamente 0,2 g/l); un anticoagulante, en una realización, presente en una cantidad suficiente como para ayudar a evitar la formación de coágulos de sangre residual (*p. ej.*, heparina o hirudina presentes a una concentración de aproximadamente 1000 unidades/l a aproximadamente 100.000 unidades/l); o una amilorida que contiene compuesto (*p. ej.*, amilorida, etil isopropil amilorida, hexameten amilorida, dimetil amilorida o isobutil amilorida presentes de aproximadamente 1,0 µM a aproximadamente 5 µM).

5.3.2. Recogida y Manipulación de Placenta

Generalmente, una placenta humana se recupera poco después de su expulsión después del nacimiento. En una realización preferible, la placenta se recupera de un paciente después del consentimiento informado y después tomar un historial médico completa del paciente y se asocia con la placenta. Preferiblemente, el historial médico continúa después del parto. Un historial médico de ese tipo se puede usar para coordinar el uso posterior de la placenta o las células recogidas a partir de la misma. Por ejemplo, las células de placenta humanas se pueden usar, en vista del historial médico, para medicina personalizada para el niño asociado a la placenta, o para padres, hermanos u otros parientes del niño.

Antes de recuperar el perfundido, la sangre del cordón umbilical y la sangre de placenta se retiran. En ciertas realizaciones, después del parto, la sangre del cordón umbilical en la placenta se recupera. La placenta se puede someter a un proceso de recuperación de sangre del cordón umbilical convencional. Por lo general se usa una aguja o una cánula, con la ayuda de la gravedad, para exsanguinar la placenta (véase, *p. ej.*, Anderson, documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.372.581; Hessel *et al*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.415.665). La aguja o cánula normalmente se coloca en la vena umbilical y la placenta se puede más a girar suavemente para ayudar a drenar la sangre del cordón de la placenta. La recuperación de la sangre del cordón de ese tipo se puede realizar de forma comercial, *p. ej.*, LifeBank Inc., Cedar Knolls, N.J., ViaCord, Cord Blood Registry y CryoCell. Preferiblemente, la placenta se drena con gravedad sin manipulación adicional con el fin de minimizar la alteración del tejido durante la recuperación de la sangre del cordón umbilical.

Por lo general, una placenta se transforma desde la habitación de parto o nacimiento a otra ubicación, *p. ej.*, un laboratorio, para recuperar la sangre del cordón umbilical y recoger el perfundido. Preferentemente la placenta se transporta en un dispositivo de transporte aislado térmicamente, estéril (manteniendo la temperatura de la placenta entre 20-28 °C), por ejemplo, colocando la placenta, con el cordón umbilical proximal pinzado, en una bolsa de plástico con cierre de cremallera estéril, que a continuación se coloca en un recipiente aislado. En otra realización, la placenta se transporta en un kit de recogida de sangre del cordón umbilical básicamente como se describe en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.147.626. Preferiblemente, la placenta se transportar al laboratorio de cuatro a veinticuatro horas después del parto. En ciertas realizaciones, el cordón umbilical proximal se pinza, preferiblemente a 4-5 cm (centímetros) de la inserción del disco de la placenta antes de la recuperación de la sangre del cordón. En otras realizaciones, el cordón umbilical proximal se pinza después de la recuperación de la sangre del cordón pero antes del procesamiento adicional de la placenta.

La placenta, antes de la recogida del perfundido, se puede almacenar en condiciones estériles y a cualquiera de temperatura ambiente o a una temperatura de 5 a 25 °C (centígrados). La placenta se puede almacenar durante un periodo de tiempo superior a cuarenta y ocho horas, y preferiblemente durante un periodo de cuatro a veinticuatro horas antes de la perfusión de la placenta para retirar cualquier sangre del cordón residual. La placenta se almacena preferiblemente en una solución anticoagulante a una temperatura de 5 °C a 25 °C (centígrados). En la técnica se conocen soluciones anticoagulantes adecuadas. Por ejemplo se puede usar una solución de heparina o warfarina de sodio. Preferiblemente, la solución anticoagulante comprende una solución de heparina (*p. ej.*, un 1 % en p/p en solución a 1:1000). La placenta exsanguinada se almacena preferiblemente durante no más de 36 horas antes de recoger el perfundido de placenta.

5.3.3. Perfusión de la Placenta

En Hariri, documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 7.045.148 y 7.255.879, y en las Publicaciones de Solicitud de Estados Unidos N.ºs 2007/0190042 (documento de Patente de Estados Unidos N.º 9.598.669) y 20070275362 (documento de Patente de Estados Unidos N.º 8.057.788), *p. ej.*, se describen métodos de perfusión de placentas de mamífero.

El perfundido se puede obtener mediante pase de solución de perfusión, *p. ej.*, solución salina, medio de cultivo o composiciones de recogida celular que se han descrito anteriormente, a través de la vasculatura de la placenta. En una realización, una placenta de mamíferos se perfunde mediante pase de solución de perfusión a través de cualquiera o ambas de la arteria umbilical y la vena umbilical. El flujo de la solución de perfusión a través de la placenta se puede conseguir usando, *p. ej.*, flujo por gravedad en la placenta. Preferiblemente, la solución de perfusión se fuerza a través de la placenta usando una bomba, *p. ej.*, una bomba peristáltica. La vena umbilical se puede, *p. ej.*, canular con una cánula, *p. ej.*, a TEFLON® o cánula de plástico, que se conecta a un aparato de

conexión estéril, tal como entubado estéril. El aparato de conexión estéril se conecta a un colector de perfusión.

En la preparación para la perfusión, la placenta se orienta preferiblemente de un modo tal que la arteria umbilical y la vena umbilical se sitúan en el punto más elevado de la placenta. La placenta se puede perfundir mediante el pase 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 realización, la arteria umbilical y la vena umbilical se conectan en forma simultánea a una pipeta que se conecta a través de un conector flexible a un depósito de la solución de perfusión. La solución de perfusión se pasa en la vena y 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 recoge en un recipiente abierto adecuado desde la superficie de la placenta que estuvo unida al útero de la madre durante la gestación. La solución de perfusión también se puede introducir a través de la abertura del cordón umbilical y se permite que fluya o salga mediante percolación de las aberturas en la pared de la placenta que tienen sus caras en contacto con la pared uterina materna. En otra realización, la solución de perfusión se pasa a través de las venas umbilicales y se recoge desde la arteria umbilical, o se pasa a través de la arteria umbilical y se recoge desde las venas umbilicales, es decir, se pasa solamente a través de la vasculatura de la placenta (tejido fetal).

En una realización, por ejemplo, la arteria umbilical y la vena umbilical se conectan de forma simultánea, *p. ej.*, a una pipeta que se conecta a través de un conector flexible a un depósito de la solución de perfusión. La solución de perfusión se pasa en la vena y 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 recoge en un recipiente abierto adecuado desde la superficie de la placenta que estuvo unida al útero de la madre durante la gestación. La solución de perfusión también se puede introducir a través de la abertura del cordón umbilical y se permite que fluya o salga mediante percolación de las aberturas en la pared de la placenta que tienen sus caras en contacto con la pared uterina materna. Las células de la placenta que se recogen con este método, que se puede denominar método de "pan", son generalmente una mezcla de células fetales y maternas.

En otra realización, la solución de perfusión se pasa a través de las venas umbilicales y se recoge de la arteria umbilical, o se pasa a través de la arteria umbilical y se recoge desde las venas umbilicales. Las células de placenta recogidas con este método, que se puede denominar método de "circuito cerrado", generalmente son casi exclusivamente fetales.

El método de perfusión de circuito cerrado, en una realización, se puede realizar como sigue a continuación. Una placenta post-parto se obtiene dentro de las 48 horas después del nacimiento. El cordón umbilical se pinza y se corta por encima del pinzamiento. El cordón umbilical se puede descartar, o se puede procesar para recuperar, *p. ej.*, células madre del cordón umbilical, y/o para procesar la membrana del cordón umbilical para la producción de un biomaterial. La membrana amniótica se puede retener durante la perfusión, o se puede separar del corión, *p. ej.*, usando disección cortante con los dedos. Si la membrana amniótica se separa del corión antes de la perfusión, ésta se puede, *p. ej.*, descartar, o procesar, *p. ej.*, para obtener células madre mediante digestión enzimática, o para producir, *p. ej.*, un biomaterial de membrana amniótica, *p. ej.*, el biomaterial que se describe en la Publicación de Solicitud de Estados Unidos N.º 2004/0048796. Después de la limpieza de la placenta de todos los óvulos sanguíneos visibles y sangre residual, *p. ej.*, usando una gasa estéril, los vasos del cordón umbilical se exponen, *p. ej.*, mediante corte parcial de la membrana del cordón umbilical para exponer una sección transversal del cordón. Los vasos se identifican con él se abren, *p. ej.*, introduciendo una pinza de cocodrilo cerrada a través del extremo de corte de cada recipiente. El aparato, *p. ej.*, tubo de plástico conectado a un dispositivo de perfusión o bomba peristáltica, a continuación se inserta en cada una de las arterias de la placenta. La bomba puede ser cualquier bomba adecuada para la finalidad, *p. ej.*, una bomba peristáltica. El tubo de plástico, conectado a un depósito de recogida estéril, *p. ej.*, una bolsa de sangre tal como una bolsa de recogida de 250 ml, a continuación se inserta en la vena de la placenta. Como alternativa, el tubo conectado a la bomba se inserta en la vena de la placenta, y los tubos a un depósito o depósitos de recogida se insertan en una o ambas de las arterias de la placenta. La placenta a continuación se perfunde con un volumen de solución de perfusión, *p. ej.*, aproximadamente 750 ml de solución de perfusión. A continuación las células en el perfundido se recogen, *p. ej.*, mediante centrifugación.

En una realización, el cordón umbilical proximal se pinza durante la perfusión, y más preferiblemente, se pinza a 4-5 cm (centímetros) de la inserción del cordón en el disco de la placenta.

La primera recogida de fluido de perfusión de una placenta de mamífero durante el proceso de exsanguinación está coloreada generalmente con células de glóbulos rojos residuales de la sangre del cordón y/o sangre de la placenta. El fluido de perfusión se hace más transparente medida que la perfusión evoluciona y las células sanguíneas del cordón residual se retiran mediante lavado de la placenta. Generalmente son adecuados de 30 a 100 ml de fluido de perfusión para lavar la sangre de la placenta abundantemente, se puede usar más o menos fluido de perfusión dependiendo de los resultados observados.

El volumen del líquido de perfusión usado para perfundir la placenta puede variar dependiendo del número de células de placenta que se van a recoger con el tamaño de la placenta, el número de recogidas que se van a hacer dentro de una sola placenta, *etc.* En diversas realizaciones, el volumen de líquido de perfusión puede ser de 50 ml a 5000 ml, de 50 ml a 4000 ml, de 50 ml a 3000 ml, de 100 ml a 2000 ml, de 250 ml a 2000 ml, de 500 ml a 2000 ml, o de 750 ml a 2000 ml. Generalmente, la placenta se perfunde con 700-800 ml de líquido de perfusión después de la

exsanguinación.

La placenta se puede perfundir una pluralidad de veces durante el transcurso de varias horas o varios días. Cuando la placenta se va a perfundir una pluralidad de veces, se puede mantener o cultivar en condiciones a sépticas en un recipiente u otro envase adecuado, y se pueden perfundir con una composición de recogida celular, o una solución de perfusión convencional (*p. ej.*, una solución salina normal tal como solución salina tamponada con 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.*, P-mercaptoetanol (0,1 mM); antibióticos tales como estreptomycin (*p. ej.*, a 40-100 µg/ml), penicilina (*p. ej.*, a 40 U/ml), anfotericina B (*p. ej.*, a 0,5 µg/ml). En una realización, una placenta aislada se mantiene o se cultiva durante un periodo de tiempo sin recogida del perfundido, de modo 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 más días antes de la perfusión y la recogida del perfundido. La placenta perfundida se puede mantener durante uno o más periodos de tiempo adicionales, *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 se puede perfundir una segunda vez con, *p. ej.*, 700-800 ml de fluido de perfusión. La placenta se puede perfundir 1, 2, 3, 4, 5 o más veces, por ejemplo, una vez cada 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. En una realización preferida, la perfusión de la placenta y la recogida de solución de perfusión, *p. ej.*, composición de recogida de células de placenta, se repite hasta que el número de células nucleadas recuperadas cae por debajo de 100 células/ml. Los perfundidos en diferentes momentos se pueden procesar individualmente para recuperar poblaciones de células dependientes del tiempo, *p. ej.*, células nucleadas totales. Los perfundidos de diferentes momentos también se pueden combinar.

20 5.3.4. Perfundido de Placenta y Células de Perfundido de Placenta

En ciertas realizaciones, el perfundido o células de perfundido se crioconservan. En otras ciertas realizaciones, el perfundido de placenta comprende, o las células de perfundido comprenden, solo células fetales, o una combinación de células fetales y células maternas.

Por lo general, el perfundido de placenta de una sola perfusión de placenta comprende de aproximadamente 100 millones a aproximadamente 500 millones de células nucleadas. En ciertas realizaciones, el perfundido de placenta o células de perfundido comprenden células CD34⁺, *p. ej.*, células madre hematopoyéticas o precursoras. Las células de ese tipo pueden, en una realización más específica, comprender células madre o precursoras CD34⁺CD45⁻, células madre o precursoras CD34⁺CD45⁺, precursores mieloides, precursores linfoides, y/o precursores eritroides. En otras realizaciones, el perfundido de placenta y células de perfundido de placenta comprenden células madre placenta adherentes, *p. ej.*, células madre CD34⁻. En otras realizaciones, el perfundido de placenta y células de perfundido de placenta comprenden, *p. ej.*, células precursoras endoteliales, células osteoprecursoras, y linfocitos citolíticos naturales.

5.4. Interrupción y Digestión de Tejido de Placenta

Los linfocitos citolíticos naturales de placenta, *p. ej.*, linfocitos PINK, se pueden obtener, por ejemplo, a partir de tejido de placenta que se ha interrumpido por vía mecánica y/o enzimática.

El tejido de placenta se puede interrumpir usando una o más enzimas degradantes de tejido, *p. ej.*, una metaloproteasa, una serina proteasa, una proteasa neutra, una RNasa, o una DNasa, o similares. Las enzimas de ese tipo incluyen, pero 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 similares. Generalmente después de la digestión, el tejido diferido se pasa a través de un colador o filtro para retirar grumos de células digeridas parcialmente, dejando una suspensión de células sustancialmente individuales.

5.5. Linfocitos Citolíticos Naturales de Placenta

En un aspecto, en la presente memoria se proporciona el aislamiento, caracterización, y uso de linfocitos citolíticos naturales que se puede obtener a partir de placenta, *p. ej.*, a partir de perfundido de placenta y/o a partir de tejido de placenta interrumpido por vía mecánica y/o por vía enzimática, y de composiciones que comprenden tales linfocitos citolíticos naturales. En una realización específica, los linfocitos citolíticos naturales de placenta son "linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta", o linfocitos "PINK", y se caracteriza que son CD56⁺CD16⁻CD3⁻, es decir, que presentan el marcador celular CD56 y que carecen de los marcadores celulares CD16 y CD3, *p. ej.*, como se determina mediante citometría de flujo, *p. ej.*, clasificación celular activada por fluorescencia usando anticuerpos contra CD16, CD3 y CD56, como se ha descrito anteriormente. Como tal, en la presente memoria se proporcionan linfocitos PINK aislados y pluralidades aisladas de linfocitos PINK. En la presente memoria también se proporcionan pluralidades aisladas de células que comprenden linfocitos PINK CD56⁺CD16⁻CD3⁻ en combinación con linfocitos citolíticos naturales CD56⁺CD16⁺. En realizaciones más específicas, los linfocitos citolíticos naturales CD56⁺CD16⁺ se pueden aislar de la placenta, o de otra fuente, *p. ej.*, sangre periférica, sangre del cordón umbilical, hueso, médula, o similares. Por lo tanto, en otras diversas realizaciones, dichos linfocitos PINK se pueden combinar con linfocitos citolíticos naturales CD56⁺CD16⁺, *p. ej.*, en proporciones de, por ejemplo, aproximadamente 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 aproximadamente 9:1. como se usa en este contexto, "aislado" se refiere a que las células se han retirado de su

entorno normal, *p. ej.*, la placenta.

En ciertas realizaciones, los linfocitos PINK son CD3⁻. En ciertos aspectos específicos, los linfocitos PINK son CD3⁻ y CD56⁺. En ciertas realizaciones, las poblaciones de linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, poblaciones de linfocitos PINK, comprenden al menos un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 % o un 99 % de linfocitos citolíticos naturales CD3⁻, CD56⁺, *p. ej.*, linfocitos PINK. En realizaciones específicas, los linfocitos citolíticos naturales son además CD16⁻, es decir, los linfocitos PINK son CD56⁺, CD3⁻, CD16⁻.

En otras realizaciones, los linfocitos PINK no presentan uno o más marcadores celulares presentados por linfocitos citolíticos naturales totalmente maduros (*p. ej.*, CD16), o presentan uno o más marcadores de este tipo a un nivel detectablemente reducido en comparación con linfocitos citolíticos naturales totalmente maduros, o presentan uno o más marcadores celulares asociados con precursores de linfocitos citolíticos naturales pero no linfocitos citolíticos naturales totalmente maduros. En una realización específica, un linfocito PINK proporcionado en la presente memoria expresa NKG2D, CD94 y/o NKp46, tal como se determina, *p. ej.*, mediante citometría de flujo, a un nivel detectablemente menor que un linfocito NK totalmente maduro. En otra realización específica, una pluralidad de linfocitos PINK proporcionados en la presente memoria expresa, en total, NKG2D, CD94 y/o NKp46 a un nivel detectablemente menor que un número equivalente de linfocitos NK totalmente maduros.

En ciertas realizaciones, los linfocitos PINK expresan uno o más de los microARN 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-520 g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618, y/o hsa-miR-99a a un nivel detectablemente más elevado que los linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica, tal como se determina mediante, *p. ej.*, qRT-PCR. En otra realización, los linfocitos citolíticos naturales no expresan el microARN hsa-miR-199b, o expresan el microARN hsa-miR-199b a un nivel detectablemente menor que los linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica, tal como se determina mediante, *p. ej.*, qRT-PCR.

En ciertas realizaciones, los linfocitos citolíticos naturales de placenta, *p. ej.*, linfocitos PINK, se han expandido en cultivo. En otras ciertas realizaciones, las células de perfundido de placenta se han expandido en cultivo. En una realización específica, dichas células de perfundido de placenta se han expandido en presencia de una capa alimentadora y/o en presencia de al menos una citoquina. En una realización más específica, dicha capa alimentadora comprende células K562 o células mononucleares de sangre periférica. En otra realización más específica, dicha al menos una citoquina es interleuquina-2.

En otra realización, en la presente memoria se proporciona una pluralidad aislada (*p. ej.*, población) de linfocitos PINK. En otra realización específica, la población aislada de células se produce mediante aislamiento de micropérlas de CD56 de células de perfundido de placenta. En diversas realizaciones específicas, la población comprende al menos aproximadamente un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de linfocitos PINK. En otra realización, la pluralidad de linfocitos PINK comprende, o consiste en, linfocitos PINK que no se han expandido; *p. ej.*, son tal como se recogen a partir de perfundido de placenta. En otra realización, la pluralidad de linfocitos PINK comprende, o consiste en, linfocitos PINK que se han expandido. Los métodos para expandir linfocitos citolíticos naturales se han descrito, *p. ej.*, en Ohno *et al.*, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2003/0157713; véase también Yssel *et al.*, *J. Immunol Methods* 72 (1):219-227 (1984) y Litwin *et al.*, *J. Exp. Med.* 178 (4): 1321-1326 (1993) y la descripción de expansión de linfocitos citolíticos naturales en el Ejemplo 1, que sigue a continuación.

En otras realizaciones, la pluralidad de linfocitos PINK no presenta uno o más marcadores celulares presentados por los linfocitos citolíticos naturales totalmente maduros (*p. ej.*, CD 16), o presenta uno o más de tales marcadores a un nivel detectablemente reducido en comparación con los linfocitos citolíticos naturales totalmente maduros, o presenta uno o más marcadores celulares asociados con precursores de linfocitos citolíticos naturales pero no asociados con linfocitos citolíticos naturales totalmente maduros. En una realización específica, un linfocito PINK proporcionado en la presente memoria expresa NKG2D, CD94 y/o NKp46, tal como se detecta, *p. ej.*, mediante citometría de flujo, a un nivel detectablemente menor que un linfocito NK totalmente maduro. En otra realización específica, una pluralidad de linfocitos PINK proporcionados en la presente memoria expresa, en total, NKG2D, CD94 y/o NKp46 a un nivel detectablemente menor que un número equivalente de linfocitos NK totalmente maduros.

En ciertas realizaciones específicas, la población de linfocitos PINK expresa uno o más de los microARN 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-520 g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618, y/o hsa-miR-99a, a un nivel detectablemente más elevado que los linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica, tal como se determina, *p. ej.*, mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). En otra realización específica, la población de linfocitos PINK expresa una cantidad detectablemente mayor de granzima B que un número equivalente de sangre periférica linfocitos citolíticos naturales.

En otras realizaciones, los linfocitos PINK proporcionados en la presente memoria se han expandido en cultivo. En realizaciones específicas, los linfocitos PINK se han cultivado, *p. ej.*, expandido en cultivo, durante al menos,

aproximadamente, 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 realización específica, los linfocitos PINK se cultivan durante aproximadamente 21 días.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona una población de células aisladas, *p. ej.*, células de placenta, que comprenden linfocitos PINK. En un aspecto específico, la población aislada de células es de células nucleadas totales de perfundido de placenta, *p. ej.*, células de perfundido de placenta, que comprenden linfocitos PINK autólogos, aislados. En otro aspecto específico, la población de células es una población de células aisladas producida por aislamiento de microperlas de CD56 de células de perfundido de placenta. En diversos aspectos, la población comprende al menos aproximadamente un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 % o al menos aproximadamente 99 % de linfocitos PINK.

Dado que la placenta post-parto comprende tejidos y células del feto y del perfundido de placenta de la madre, dependiendo del método de recogida, puede comprender solamente células fetales, o una mayoría básica de células fetales (*p. ej.*, más de aproximadamente un 90 %, un 95 %, un 98 % o un 99 %), o puede comprender una mezcla de células fetales y maternas (*p. ej.*, las células fetales comprenden menos de aproximadamente un 90 %, un 80 %, un 70 %, un 60 %, o un 50 % de las células nucleadas totales del perfundido). En una realización, los linfocitos PINK se obtienen solamente a partir de células de placenta fetal, *p. ej.*, células obtenidas a partir de la perfusión en circuito cerrado de la placenta (véase anteriormente) en donde la perfusión produce perfundido que comprende una mayoría básica, o solamente, células de placenta fetal. En otra realización, los linfocitos PINK se obtienen a partir de células fetales y maternas, *p. ej.*, células obtenidas mediante perfusión con el método de selección (véase anteriormente), en donde la perfusión produjo perfundido que comprendía una mezcla de células de placenta fetales y maternas. Por lo tanto, en una realización, en la presente memoria se proporciona una población de linfocitos citolíticos naturales intermedios obtenidos a partir de placenta, la mayoría básica de los cuales tienen el genotipo fetal. En otra realización, en la presente memoria se proporciona una población de linfocitos citolíticos naturales intermedios obtenidos a partir de placenta que comprenden linfocitos citolíticos naturales que tienen el genotipo fetal y linfocitos citolíticos naturales que tienen el fenotipo materno.

En la presente memoria también se proporcionan poblaciones de linfocitos citolíticos naturales intermedios obtenidos a partir de placenta que comprenden linfocitos citolíticos naturales de una fuente que no es placenta. Por ejemplo, una realización que se describe, en la presente memoria se describe la población de linfocitos PINK que también comprende linfocitos citolíticos naturales de sangre del cordón umbilical, sangre periférica, médula ósea, o una combinación de dos o más de los mencionados anteriormente. Las poblaciones de linfocitos citolíticos naturales que comprenden linfocitos PINK y linfocitos citolíticos naturales que no son de una fuente de placenta pueden comprender las células en, *p. ej.*, a una proporción de aproximadamente 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, 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, o aproximadamente 1:100, o similares.

Los aspectos adicionales que se describen en la presente memoria son combinaciones de sangre del cordón umbilical y linfocitos PINK aislados. En diversos aspectos, la sangre del cordón umbilical se combina con linfocitos PINK a aproximadamente 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, linfocitos PINK por mililitro de sangre del cordón umbilical.

En la presente memoria también se proporciona métodos para aislar linfocitos PINK. En una realización, los linfocitos PINK se recogen mediante obtención de perfundido de placenta, y a continuación poniendo en contacto el perfundido de placenta con una composición que se une de forma específica a células CD56⁺, *p. ej.*, un anticuerpo contra CD56, seguido del aislamiento de células CD56⁺ basándose en dicha unión para formar una población de células CD56⁺. La población de células CD56⁺ comprende una población aislada de linfocitos citolíticos naturales. En una realización específica, las células CD56⁺ se ponen en contacto con una composición que se une de forma específica a células CD16⁺, *p. ej.*, un anticuerpo contra CD16, y las células CD16⁺ de la población de células CD56⁺. En otra realización específica, las células CD3⁺ también se excluyen de la población de células CD56⁺.

En una realización, los linfocitos PINK se pueden obtener a partir de perfundido de placenta como sigue a continuación. Una placenta humana post-parto se exsanguina y se perfunde, *p. ej.*, con aproximadamente 200-800 ml de solución de perfusión, a través de la vasculatura de la placenta solo. En una realización específica, la placenta se drena de sangre de cordón umbilical y se lava abundantemente, *p. ej.*, con solución de perfusión, a través de la vasculatura de la placenta para retirar sangre residual antes de dicha perfusión. El perfundido se recoge y se procesa para retirar cualquier eritrocito residual. Los linfocitos citolíticos naturales en las células nucleadas totales en el perfundido se pueden aislar basándose en la expresión de CD56 y CD16. En ciertas realizaciones, el aislamiento de los linfocitos PINK comprende el aislamiento usando un anticuerpo para CD56, en donde las células aisladas son CD56⁺. En otra realización, el aislamiento de los linfocitos PINK comprende el aislamiento usando un anticuerpo para CD16, en donde las células aisladas son CD16⁻. En otra realización, el aislamiento de los linfocitos PINK comprende el aislamiento usando un anticuerpo para CD56, y exclusión de una pluralidad de linfocitos no PINK usando un anticuerpo para CD16, en donde las células aisladas comprenden células CD56⁺, CD16⁻.

Después de obtener una suspensión de células de placenta, *p. ej.*, a partir de perfundido de placenta o a partir de tejido de placenta digerido de forma enzimática, los linfocitos citolíticos naturales se pueden aislar o enriquecer usando, *p. ej.*, anticuerpos para CD3 y CD56. En una realización específica, los linfocitos citolíticos naturales de placenta se aíslan seleccionando células que son CD56⁺ para producir una primera población celular; poniendo en contacto dicha primera población celular con anticuerpos específicos para CD3 y/o CD16; y retirando células de dicha primera población celular que son CD3⁺ o CD16⁺, produciendo de ese modo una segunda población de células que son básicamente CD56⁺ y CD3⁻, CD56⁺ y CD16⁻, o CD56⁺, CD3⁻ y CD16⁻.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para aislar linfocitos citolíticos naturales de placenta, que comprende linfocitos PINK CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻, que comprende la obtención de una pluralidad de células de placenta, y aislamiento de linfocitos citolíticos naturales a partir de dicha pluralidad de células de placenta. En una realización específica, las células de placenta son, o comprenden, células de perfundido de placenta, *p. ej.*, células nucleadas totales de perfundido de placenta. En otra realización específica, dicha pluralidad de células de placenta son, o comprenden, células de placenta obtenidas mediante digestión mecánica y/o enzimática de tejido de placenta. En otra realización, dicho aislamiento se realiza usando uno o más anticuerpos. En una realización más específica, dicho uno o más anticuerpos comprende uno o más de los anticuerpos CD3, CD16 o CD56. En una realización más específica, dicho aislamiento comprende el aislamiento de células CD56⁺ de células CD56⁻ en dicha pluralidad de células de placenta. En una realización más específica, dicho aislamiento comprende el aislamiento de células de placenta CD56⁺, CD16⁻, *p. ej.*, linfocitos citolíticos naturales de placenta, *p. ej.*, linfocitos PINK, de células de placenta que son CD56⁻ o CD16⁺. En una realización más específica, dicho aislamiento comprende el aislamiento de células de placenta CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻ que son CD56⁻, CD16⁺, o CD3⁺. En otro aspecto, los linfocitos NK de placenta, *p. ej.*, linfocitos PINK, se aíslan no se enriquecen poniendo en contacto una pluralidad de células que comprenden los linfocitos NK con un anticuerpo para CD5 y un anticuerpo para CD56, y aislando células que son CD56⁺ y CD5⁻, en donde dichas células CD56⁺ y CD5⁻ están enriquecidas con linfocitos citolíticos naturales de placenta, *p. ej.*, linfocitos PINK. En otra, dicho método de aislamiento de linfocitos citolíticos naturales de placenta da como resultado una población de células de placenta que tiene al menos un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 % o al menos un 99 % de linfocitos citolíticos naturales CD56⁺, CD16⁻.

La separación celular se puede realizar con cualquier método conocido en la técnica, *p. ej.*, citometría de flujo, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), o clasificación celular magnética usando microperlas conjugadas con anticuerpos específicos. Las células se pueden aislar, *p. ej.*, usando una técnica de clasificación celular activada magnética (MACS), un método para separar partículas basándose en su capacidad para unirse a perlas magnéticas (*p. ej.*, con un diámetro de aproximadamente 0,5-100 µm) que comprende uno o más anticuerpos específicos, *p. ej.*, anticuerpos anti-CD56. La separación celular magnética se puede realizar y automatizar usando, *p. ej.*, un Separador AUTOMACS™ (Miltenyi). En las microesferas se pueden realizar una diversidad de modificaciones útiles, incluyendo adición covalente de anticuerpo que reconoce de forma específica una molécula o hapteno particular de superficie molecular. A continuación las perlas se mezclan con las células para permitir su unión. A continuación las células se pasan a través de un campo magnético para retirar mediante separación las células que tienen el marcador de superficie celular es decir. En una realización, estas células a continuación se aíslan y se vuelven a mezclar con perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo contra marcadores de superficie celular adicionales. En esta realización, las células se pasan de nuevo a través de un campo magnético, aislando células que se unen ambos anticuerpos. Las células de ese tipo a continuación se pueden diluir en placas separadas, tales como placas de microtitulación para aislamiento clonal.

Opcionalmente, los linfocitos citolíticos naturales aislados o enriquecidos se pueden confirmar en un ensayo de citotoxicidad usando células tumorales, *p. ej.*, células tumorales K562 cultivadas, o similares tales como células diana.

5.6. Linfocitos Citolíticos Naturales de Placenta de Perfundido y Sangre del Cordón Umbilical Emparejados

Además en la presente memoria se proporcionan linfocitos citolíticos naturales obtenidos con el que se pueden obtener a partir de, combinaciones de unidades emparejadas de perfundido de placenta y sangre del cordón umbilical, en la presente memoria denominados linfocitos citolíticos naturales combinados. Las "unidades emparejadas", como se usa en la presente memoria, indican que los linfocitos NK se obtienen a partir de células de perfundido de placenta, y células de sangre del cordón umbilical, en donde las células de sangre del cordón umbilical se obtienen a partir de sangre del cordón umbilical de la placenta a partir de la cual se obtienen el perfundido de placenta, es decir, las células de perfundido de placenta y células de sangre del cordón umbilical, y por lo tanto los linfocitos citolíticos naturales de cada uno, son del mismo individuo.

En ciertos aspectos, los linfocitos citolíticos de placenta combinados comprenden solo, o básicamente solo, los linfocitos citolíticos naturales que son CD56⁺ y CD16⁻. En otros ciertos aspectos, los linfocitos citolíticos de placenta combinados comprenden linfocitos NK que son CD56 y CD16⁻, y linfocitos NK que son CD56⁺ y CD16⁺. En ciertas realizaciones específicas, los linfocitos citolíticos de placenta combinados comprenden al menos un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 99.5 % de linfocitos citolíticos naturales (linfocitos PINK) CD56⁺CD16⁻CD3⁻.

En una realización, los linfocitos citolíticos naturales combinados no se han cultivado. En una realización específica, los linfocitos citolíticos naturales combinados comprenden un número detectablemente más elevado de linfocitos citolíticos naturales CD3⁻CD56⁺CD16⁻ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica. En otra realización específica, los linfocitos citolíticos naturales combinados comprenden un número de linfocitos citolíticos naturales CD3⁻CD56⁺CD16⁺ detectablemente menor que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica. En otra realización específica, los linfocitos citolíticos naturales combinados comprenden un número detectablemente más elevado de linfocitos citolíticos naturales CD3⁻CD56⁺KIR2DL2/L3⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica. En otra realización específica, los linfocitos citolíticos naturales combinados comprenden un número detectablemente menor de linfocitos citolíticos naturales CD3⁻CD56⁺NKp46⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica. En otra realización específica, los linfocitos citolíticos naturales combinados comprenden un número detectablemente menor de linfocitos citolíticos naturales CD3⁻CD56⁺NKp30⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica. En otra realización específica, los linfocitos citolíticos naturales combinados comprenden un número detectablemente menor de linfocitos citolíticos naturales CD3⁻CD56⁺2B4⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica. En otra realización específica, los linfocitos citolíticos naturales combinados comprenden un número detectablemente menor de linfocitos citolíticos naturales CD3⁻CD56⁺CD94⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica.

En otra realización, los linfocitos citolíticos naturales combinados se han cultivado, *p. ej.*, durante 21 días. En una realización específica, los linfocitos citolíticos naturales combinados comprenden un número detectablemente menor de linfocitos citolíticos naturales CD3⁻CD56⁺KIR2DL2/L3⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica. En otra realización específica, los linfocitos citolíticos naturales combinados no se han cultivado. En otra realización específica, los linfocitos citolíticos naturales combinados comprenden un número detectablemente más elevado de linfocitos citolíticos naturales CD3⁻CD56⁺NKp44⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica. En una realización específica, los linfocitos citolíticos naturales combinados comprenden un número detectablemente más elevado de linfocitos citolíticos naturales CD3⁻CD56⁺NKp30⁺ que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica.

En otra realización, los linfocitos citolíticos naturales combinados expresan una cantidad detectablemente mayor de granzima B que un número equivalente de sangre periférica linfocitos citolíticos naturales.

Además en la presente memoria se proporcionan combinaciones de sangre del cordón umbilical y linfocitos citolíticos naturales combinados. En diversas realizaciones, la sangre del cordón umbilical se combina con linfocitos citolíticos naturales combinados a aproximadamente 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 linfocitos citolíticos naturales combinados por mililitro de sangre del cordón umbilical.

5.7. Combinaciones de Perfundido/Célula

Además de perfundido de placenta, células de perfundido de placenta, linfocitos citolíticos naturales combinados, y linfocitos citolíticos naturales de placenta, *p. ej.*, linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta, en la presente memoria se proporcionan composiciones que comprenden el perfundido o células, para uso en la supresión de la proliferación de una célula tumoral o una pluralidad de células tumorales.

5.7.1. Combinaciones de Perfundido de Placenta, Células de Perfundido Y Linfocitos Citolíticos Naturales Intermedios Obtenidos a partir de Placenta

Además en la presente memoria se proporcionan composiciones que comprenden combinaciones de la placenta que comprenden perfundido de placenta, células de perfundido de placenta, linfocitos citolíticos naturales que comprenden linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻, y/o linfocitos citolíticos naturales combinados que se describen en las Secciones que se han mencionado anteriormente. En un aspecto de la descripción, por ejemplo, en la presente memoria se describe un volumen de perfundido de placenta suplementado con células de perfundido de placenta y/o linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta, por ejemplo, obtenidos a partir de células de perfundido de placenta o tejido de placenta que se han interrumpido por vía mecánica o por vía enzimática. En realizaciones específicas, por ejemplo, cada mililitro de perfundido de placenta se suplementa con aproximadamente 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 de perfundido de placenta, los linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta, y/o linfocitos citolíticos naturales combinados. En otro aspecto de la descripción, las células de perfundido de placenta se suplementan con perfundido de placenta, linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta, y/o linfocitos citolíticos naturales combinados. En otro aspecto de la descripción, los linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta, se suplementan con perfundido de placenta, células de perfundido de placenta, y/o linfocitos citolíticos naturales combinados.

En ciertos aspectos de la descripción, cuando se usa perfundido para suplemento, el volumen de perfundido es aproximadamente, mayor que aproximadamente, o menor que aproximadamente, un 50 %, un 45 %, un 40 %, un 35 %, un 30 %, un 25 %, un 20 %, un 15 %, un 10 %, un 8 %, un 6 %, un 4 %, un 2 % o un 1 % del volumen total de células (en solución) más perfundido. En otros aspectos de la descripción, cuando las células de perfundido de

placenta se combinan con una pluralidad de linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos PINK y/o linfocitos citolíticos naturales combinados, las células de perfundido de placenta generalmente comprenden aproximadamente, más de aproximadamente, o menos de aproximadamente, un 50 %, un 45 %, un 40 %, un 35 %, un 30 %, un 25 %, un 20 %, un 15 %, un 10 %, un 8 %, un 6 %, un 4 %, un 2 % o un 1 % del número de células. En otros ciertos aspectos de la prescripción, cuando los linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos PINK se combinan con una pluralidad de células de perfundido de placenta y/o linfocitos citolíticos naturales combinados, los linfocitos NK generalmente comprenden aproximadamente, más de aproximadamente, o menos de aproximadamente, un 50 %, un 45 %, un 40 %, un 35 %, un 30 %, un 25 %, un 20 %, un 15 %, un 10 %, un 8 %, un 6 %, un 4 %, un 2 % o un 1 % del número total de células. En otras ciertas realizaciones, cuando los linfocitos citolíticos naturales combinados se combinan con linfocitos citolíticos naturales que comprenden linfocitos PINK CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻; los linfocitos citolíticos naturales combinados generalmente comprenden aproximadamente, más de aproximadamente, o menos de aproximadamente, un 50 %, un 45 %, un 40 %, un 35 %, un 30 %, un 25 %, un 20 %, un 15 %, un 10 %, un 8 %, un 6 %, un 4 %, un 2 % o un 1 % del número total de células. En ciertos otros aspectos de la descripción, cuando se usan linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos PINK, linfocitos citolíticos naturales combinados o células de perfundido de placenta para suplementar perfundido de placenta, el volumen de solución (*p. ej.*, solución salina, medio de cultivo o similares) en los que las células se suspenden comprende aproximadamente, más de aproximadamente, o menos de aproximadamente, un 50 %, un 45 %, un 40 %, un 35 %, un 30 %, un 25 %, un 20 %, un 15 %, un 10 %, un 8 %, un 6 %, un 4 %, un 2 % o un 1 % del volumen total de perfundido más células, donde los linfocitos NK se suspenden a aproximadamente 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 antes del suplemento.

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

Además en la presente memoria se describe perfundido de placenta combinado que se obtiene a partir de dos o más fuentes, *p. ej.*, dos o más placentas, y se combina, *p. ej.*, se agrupa. Un perfundido combinado de ese tipo puede comprender volúmenes aproximadamente iguales de perfundido de cada fuente, o puede comprender volúmenes diferentes de cada fuente. Los volúmenes relativos de cada fuente se pueden seleccionar de forma aleatoria, o se puede basar en, *p. ej.*, una concentración o cantidad de uno o más factores celulares, *p. ej.*, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, o similares; el número de células de placenta en el perfundido de cada fuente; u otras características del perfundido de cada fuente. El perfundido de múltiples perfusiones de la misma placenta se puede combinar del mismo modo.

De forma análoga, en la presente memoria se proporcionan linfocitos citolíticos naturales intermedios CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻ obtenidos a partir de placenta, que se obtienen a partir de dos o más fuentes, *p. ej.*, dos o más placentas, y se combinan. Las células combinadas de ese tipo pueden comprender aproximadamente números iguales de células de las dos o más fuentes, o diferentes números de células de un algo más de las fuentes combinadas. Los números relativos de células de cada fuente se pueden seleccionar basándose en, *p. ej.*, el número de uno o más tipos específicos de células en las células que se van a combinar, *p. ej.*, el número de células CD34⁺, el número de células CD56⁺, *etc.*

Las combinaciones pueden comprender, *p. ej.*, perfundido de placenta suplementado con células de perfundido de placenta; perfundido de placenta suplementado con linfocitos citolíticos naturales intermedios (PINK) obtenidos a partir de placenta; perfundido de placenta suplementado tanto con células de perfundido de placenta como con linfocitos PINK; células de perfundido de placenta suplementadas con perfundido de placenta; células de perfundido de placenta suplementadas con linfocitos PINK; células de perfundido de placenta suplementadas tanto con perfundido de placenta como con linfocitos PINK; linfocitos PINK suplementados con perfundido de placenta; linfocitos PINK suplementados con células de perfundido de placenta; o linfocitos PINK suplementados tanto con células de perfundido de placenta como con perfundido de placenta.

Además en la presente memoria se proporcionan linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta, y agrupamientos de los mismos o combinaciones de los mismos, que se han sometido a ensayo para determinar el grado o cantidad de supresión tumoral (es decir, la potencia) que se va a esperar de, *p. ej.*, un número dado de linfocitos PINK. Por ejemplo, una alícuota o número de células de muestra se pone en contacto con un número conocido de células tumorales en condiciones en las que las células tumorales podrían proliferar de otro modo, y la tasa de proliferación de las células tumorales en presencia de perfundido de placenta, células de perfundido, linfocitos citolíticos naturales de placenta, o combinaciones de los mismos, a lo largo del tiempo (*p. ej.*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 semanas o un periodo de tiempo superior) se compara con la proliferación de un número equivalente de las células tumorales en ausencia de perfundido, células de perfundido, linfocitos citolíticos naturales de placenta, o combinaciones de los mismos. La potencia del perfundido de placenta, células de perfundido de placenta y/o linfocitos PINK, o combinaciones o agrupamientos de los mismos, se puede expresar, *p. ej.*, como el número de células o volumen de solución necesario para suprimir el crecimiento de las células tumorales, *p. ej.*, en aproximadamente un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, o similares.

En ciertas realizaciones, se proporcionan linfocitos citolíticos naturales que comprenden linfocitos PINK CD56⁺ CD16⁻ CD3⁻ como unidades de administración de calidad farmacéutica. Las unidades de ese tipo se pueden proporcionar en volúmenes discretos, *p. ej.*, 100 ml, 150 ml, 200 ml, 250 ml, 300 ml, 350 ml, 400 ml, 450 ml, 500 ml,

o similares. Las unidades de ese tipo se pueden proporcionar con el fin de que contengan un número especificado de, *p. ej.*, células de perfundido de placenta, linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta, o ambos, *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. Las unidades de ese tipo se pueden proporcionar para que contengan números especificados de cualquiera cualesquiera dos, o los tres, de perfundido de placenta, células de perfundido de placenta, y/o linfocitos PINK.

En las combinaciones que se han mencionado anteriormente de perfundido de placenta, células de perfundido de placenta y/o linfocitos PINK, uno cualquiera, cualesquiera de los dos, o los tres del perfundido de placenta, células de perfundido de placenta y/o linfocitos PINK pueden ser autólogos para un receptor (es decir, se pueden obtener a partir del receptor), o pueden ser homólogos para un receptor (es decir, se obtienen a partir de al menos otro individuo de dicho receptor).

Cualquiera de las combinaciones o agrupamientos que se han mencionado anteriormente de linfocitos PINK, células de perfundido de placenta y/o perfundido de placenta pueden comprender linfocitos citolíticos naturales $CD56^+CD16^+$ de, *p. ej.*, perfundido de placenta, sangre periférica, sangre del cordón umbilical, médula ósea, o similares. En realizaciones específicas, las combinaciones comprenden aproximadamente, al menos aproximadamente, o como máximo aproximadamente 1×10 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 o más de tales linfocitos citolíticos naturales 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. Los linfocitos citolíticos naturales $CD56^+CD16^+$ se pueden usar como aislados a partir de la fuente natural, o se pueden expandir antes de su inclusión en una de las combinaciones o agrupamientos que se han mencionado anteriormente. Los linfocitos NK $CD56^+CD16^+$ pueden ser a ortólogos (es decir, se pueden hacer a partir del mismo individuo que el perfundido de placenta, células de perfundido de placenta y/o linfocitos PINK; o se puede obtener a partir de un receptor) o pueden ser homólogos (es decir, se obtienen a partir de un individuo diferente al del perfundido de placenta, células de perfundido de placenta y/o linfocitos PINK; o de un individuo que no es un receptor).

Preferentemente, cada unidad se etiqueta hasta un volumen específico, número de células, tipo de células, si la unidad se ha enriquecido para un tipo de célula en particular, potencia de un número dado de células en la unidad, o un número dado de mililitros de la unidad, y/o si las células causan una supresión mensurable de la proliferación de un tipo o tipos particulares de célula tumoral.

En la presente memoria también se proporcionan composiciones que comprenden linfocitos citolíticos naturales que comprenden linfocitos (PINK) citolíticos naturales intermedios de placenta $CD56^+ CD16^- CD3^-$, solos o en combinación con células de perfundido de placenta y/o perfundido de placenta. Por lo tanto, en otro aspecto, en la presente memoria se proporciona una composición que comprende linfocitos citolíticos naturales que comprenden linfocitos PINK $CD56^+ CD16^- CD3^-$ aislados, en donde dichos linfocitos citolíticos naturales se aíslan a partir de perfundido de placenta, y en donde dichos linfocitos citolíticos naturales comprenden al menos un 50 % de células en la composición. En una realización específica, dichos linfocitos citolíticos naturales comprenden al menos un 80 % de células en la composición. En otra realización específica, dicha composición comprende linfocitos citolíticos naturales $CD56^+$, $CD16^+$ aislados. En una realización más específica, dichos linfocitos citolíticos naturales $CD56^+$, $CD16^+$ son de un individuo diferente al de dichos linfocitos citolíticos naturales $CD56^+$, $CD16^-$. En otra realización específica, dichos linfocitos citolíticos naturales son de un solo individuo. En una realización más específica, dichos linfocitos citolíticos naturales aislados comprenden linfocitos citolíticos naturales de al menos dos individuos diferentes. En otra realización específica, la composición comprende perfundido de placenta aislado. En una realización más específica, dicho perfundido de placenta es del mismo individuo que dichos linfocitos citolíticos naturales. En otra realización más específica, dicho perfundido de placenta comprende perfundido de placenta de un individuo diferente al de dichos linfocitos citolíticos naturales. En otra realización específica, la composición comprende células de perfundido de placenta. En una realización más específica, dichas células de perfundido de placenta son del mismo individuo que dichos linfocitos citolíticos naturales. En otra realización más específica, dichas células de perfundido de placenta son de un individuo diferente al de dichos linfocitos citolíticos naturales. En otra realización específica, la composición comprende células de perfundido de placenta. En una realización más específica, dichas células de perfundido de placenta son de al menos dos individuos. En otra realización más específica de cualquiera de las realizaciones que se han mencionado anteriormente que comprenden perfundido de placenta, dicho perfundido de placenta comprende perfundido de placenta de al menos dos individuos. En otra realización más específica de cualquiera de las realizaciones que se han mencionado anteriormente que comprenden células de perfundido de placenta, dichas células de perfundido de placenta aislado son de al menos dos individuos.

5.7.2. Composiciones Que Comprenden Células Madre de Placenta Adherentes

En otras realizaciones, los linfocitos citolíticos naturales que comprenden linfocitos PINK $CD56^+ CD16^- CD3^-$, o una combinación o agrupamiento de linfocitos citolíticos naturales se suplementa con células de placenta adherentes aisladas, *p. ej.*, células madre placenta tal como se describe, *p. ej.*, en los documentos de patente de Estados Unidos N.ºs 7.045.148 and 7.255.879, y en las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2007/0275362 (documento de Patente de Estados Unidos N.º 8.057.788) y 2008/0032401. "Células de placenta

adherentes" se refiere a que las células son adherentes a plástico de cultivo celular. La expresión "célula de placenta", como se usa en la presente memoria, no incluye linfocitos citolíticos naturales a menos que se indique específicamente de otro modo. Las células de placenta adherentes útiles en las composiciones y métodos que se describen en la presente memoria no son trofoblastos, células germinales embrionarias o células madre embrionarias.

El perfundido de placenta, pluralidad de células de perfundido de placenta, y/o pluralidad de linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos PINK, o una combinación o agrupamiento de cualquiera de los que se han mencionado anteriormente se puede suplementar 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 more cells 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 de placenta adherentes. Las células de placenta adherentes en las combinaciones pueden ser, *p. ej.*, células de placenta adherentes que se han cultivado para, *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 población, o más.

Las aisladas células de placenta adherentes, cuando se cultivan en cultivos primarios o en cultivo celular, se adhieren al sustrato de cultivo tisular, *p. ej.*, superficie del recipiente de cultivo tisular (*p. ej.*, plástico de cultivo tisular). Las células de placenta adherentes en cultivo toman un aspecto generalmente fibroblastoide, estrellado, con un número de procesos citoplasmáticos extendiéndose desde el cuerpo central de la célula. Las células de placenta adherentes son, sin embargo, morfológicamente distinguibles de los fibroblastos cultivados en las mismas condiciones, ya que las células de placenta adherentes presentan un número más elevado de procesos que los fibroblastos. Morfológicamente, células de placenta adherentes también se pueden distinguir de las células madre hematopoyéticas, que generalmente toman una forma de morfología más redondeada, o de guijarro, en cultivo.

Las células de placenta adherentes aisladas, y poblaciones de células de placenta adherentes, útiles en la presente invención expresan una pluralidad de marcadores que se pueden usar para identificar y/o aislar las células, o poblaciones de células que comprenden las células de placenta adherentes. Las células de placenta adherentes, y poblaciones de células de placenta adherentes útiles en la presente invención incluyen células de placenta adherentes y poblaciones de células que contienen células de placenta adherentes obtenidas directamente de la placenta, o cualquier parte de la misma (*p. ej.*, saco amniótico, corión, placa de saco amniótico-corión, conciliadores de placenta, cordón umbilical, y similares). La población de células madre placenta adherentes, en una realización, es una población (es decir, dos o más) de células madre placenta adherentes en cultivo, *p. ej.*, una población en un recipiente, *p. ej.*, una bolsa.

En ciertas realizaciones, las células de placenta adherentes aisladas son células madre de placenta aisladas. En otras ciertas realizaciones, las células de placenta aisladas son células multi potentes de placenta aisladas. En una realización, las células de placenta aisladas son CD34⁻, CD10⁺ y CD105⁺ como se detecta mediante citometría de flujo. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son CD34⁻, CD10⁺ y CD105⁺ tienen el potencial de diferenciarse en células que tienen una característica de una célula neuronal, donde las células tienen una característica de una célula osteogénica, y/o células que tienen la característica de una célula condrogénica, *p. ej.*, ya sea *in vitro* o *in vivo*, o ambos. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son CD34⁻, CD10⁺ y CD105⁺ son además CD200⁺. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son CD34⁻, CD10⁺ y CD105⁺ son además CD45⁻ o CD90⁺. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son CD34⁻, CD10⁺ y CD105⁺ son además CD45⁻ y CD90⁺, tal como se detecta mediante citometría de flujo. En otra realización específica, las células de placenta CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ CD200⁺ aisladas son además CD90⁺ o CD45⁻, tal como se detecta mediante citometría de flujo. En otra realización específica, las células de placenta CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas son además CD90⁺ y CD45⁻, tal como se detecta mediante citometría de flujo, es decir, las células son CD34⁻, CD10⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺ y CD200⁺. En otra realización específica, dichas células CD34⁻, CD10⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺ son además CD44⁺, CD80⁻ y/o CD86⁻. En otra realización específica, dichas células CD34⁻, CD10⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺ son además una o más de CD80⁻, CD86⁻, CD117⁻, CD133⁻, citoqueratina⁺, KDR⁺, HLA-A,B,C⁺, HLA-DR,DP,DQ⁻, y HLA-G⁻. En otra realización específica, las células CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ son además una o más de SSEA1⁻, SSEA3⁻ y/o SSEA4⁻. En otra realización específica, las células CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ son además SSEA1⁻, SSEA3⁻ y SSEA4⁻.

En ciertas realizaciones, dichas células de placenta son CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ y CD200⁺, y una o más de CD38⁻, CD45⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD133⁻, HLA-DR,DP,DQ⁻, SSEA3⁻, SSEA4⁻, CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, HLA-A,B,C⁺, PDL1⁺, ABC-p⁺, y/o OCT-4⁺, tal como se detecta mediante citometría de flujo. En otras realizaciones, cualquiera de las células CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ que se han descrito anteriormente son además una o más de CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, SH3⁺ o SH4⁺. En otra realización específica, las células son además CD44⁺. En otra realización específica de cualquiera de las células de placenta aisladas son CD34⁻, CD10⁺ y CD105⁺ que se han mencionado anteriormente, las células son además una o más de CD117⁻, CD133⁻, KDR⁻ (VEGFR2), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, o Ligando 1 de Muerte Programada (PDL1)⁺, o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización, las células de placenta CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ son además una o más de CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-cadherina^{baio}, CD 184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻, o Ligando 1 de Muerte

Programada (PDL1)⁺, o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, las células de placenta CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ son además CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-cadherina^{bajo}, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻, y Ligando 1 de Muerte Programada (PDL1)⁺.

En otra realización específica, cualquiera de las células de placenta que se describen en la presente memoria son ABC-p⁺, tal como se detecta mediante citometría de flujo, o OCT-4⁺ (POU5F1⁺), tal como se determina mediante RT-PCR, en donde ABC-p es una proteína transportadora de ABC específica de placenta (también conocida como proteína de resistencia a cáncer de mama (BCRP) y como proteína de resistencia a mitoxantrona (MXR)), y OCT-4 es la proteína del Octámero-4 (POU5F1). En otra realización específica, cualquiera de las células de placenta que se describen en la presente memoria son además SSEA3⁻ o SSEA4⁻, tal como se determina mediante citometría de flujo, en donde SSEA3 es un Antígeno Embrionario Específico de Estadio 3, y SSEA4 es Antígeno Embrionario Específico de Estadio 4. En otra realización específica, cualquiera de las células de placenta que se describen en la presente memoria son además SSEA3⁻ y SSEA4⁻.

En otra realización específica, cualquiera de las células de placenta que se describen en la presente memoria son una o más de MHC-I⁺ (p. ej., HLA-A,B,C⁺), MHC-II⁻ (p. ej., HLA-DP,DQ,DR⁻) o HLA-G⁻. En otra realización específica, cualquiera de las células de placenta que se describen en la presente memoria son una o más de MHC-I⁺ (p. ej., HLA-A,B,C⁺), MHC-II⁻ (p. ej., HLA-DP,DQ,DR⁻) y HLA-G⁻.

En la presente memoria también se proporcionan poblaciones de las células de placenta aisladas, o poblaciones de células, p. ej., poblaciones de células de placenta, que comprenden, p. ej., que están enriquecidas para, las células de placenta aisladas, que son útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria. Las poblaciones preferidas de células que comprenden las células de placenta aisladas, en donde las poblaciones de células comprenden, p. ej., al menos un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o 98 % de células de placenta CD10⁺, CD105⁺ y CD34⁻ aisladas; es decir, al menos un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 98 % de células en dicha población son células de placenta CD10⁺, CD105⁺ y CD34⁻ aisladas. En un aspecto específico, las células de placenta aisladas son CD34⁻, CD10⁺ y CD105⁺ son además CD200⁺. En otra realización específica, las células de placenta CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ CD200⁺ aisladas son además CD90⁺ o CD45⁻, tal como se detecta mediante citometría de flujo. En otra realización específica, las células de placenta CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ aisladas son además CD90⁺ y CD45⁻, tal como se detecta mediante citometría de flujo. En otra realización específica, cualquiera de las células de placenta aisladas son CD34⁻, CD10⁺ y CD105⁺ que se han descrito anteriormente son además una o más de CD29⁺, CD38⁺, CD44⁺, CD54⁺, SH3⁺ o SH4⁺. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son CD34⁻, CD10⁺ y CD105⁺, o células de placenta CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas, son además CD44⁺. En una realización específica de cualquiera de las poblaciones de células que comprenden células de placenta CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ aisladas que se han mencionado anteriormente, las células de placenta aisladas son además una o más de CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-cadherina^{bajo}, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻, o Ligando 1 de Muerte Programada (PDL1)⁺, o cualquier combinación de los mismos. En otra realización específica, las células CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ son además CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-cadherina^{bajo}, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻, y Ligando 1 de Muerte Programada (PDL1)⁺.

En ciertas realizaciones, las células de placenta aisladas útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria son una o más, o todas, de CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁺, y ABC-p⁺, en donde dichas células de placenta aisladas se obtienen mediante interrupción física y/o enzimática de tejido de placenta. En una realización específica, las células de placenta aisladas son OCT-4⁺ y ABC-p⁺. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son OCT-4⁺ y CD34⁻, en donde dichas células de placenta aisladas tienen al menos una de las siguientes características: CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, y SSEA4⁻. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son OCT-4⁺, CD34⁻, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, y SSEA4⁻. En otra realización, las células de placenta aisladas son OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻, y SSEA4⁻. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son OCT-4⁺ y CD34⁻, y es cualquiera de SH2⁺ o SH3⁺. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son OCT-4⁺, CD34⁻, SH2⁺, y SH3⁺. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻, y SSEA4⁻, y son cualquiera de SH2⁺ o SH3⁺. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son OCT-4⁺ y CD34⁻, y cualquiera de SH2⁺ o SH3⁺, y es al menos una de CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SSEA3⁻, o SSEA4⁻. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son OCT-4⁺, CD34⁻, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SSEA3⁻, y SSEA4⁻, y cualquiera de SH2⁺ o SH3⁺.

En otra realización, las células de placenta aisladas útiles en los métodos y composiciones que se describen en la

presente memoria son SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ y OCT-4⁺. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺, CD34⁻, CD45⁻, SSEA3⁻, o SSEA4⁻. En otra realización, las células de placenta aisladas son SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻ y SSEA4⁻. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻ y SSEA4⁻, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺, OCT-4⁺, CD34⁻ o CD45⁻

- 5 En otra realización, las células de placenta aisladas útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria son CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, y SH4⁺; en donde dichas células de placenta aisladas son además una o más de OCT-4⁺, SSEA3⁻ o SSEA4⁻.

En ciertas realizaciones, células de placenta aisladas útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria son CD200⁺ o HLA-G⁻. En una realización específica, las células de placenta aisladas son CD200⁺ y HLA-G⁻. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son además CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son además CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son además CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células madre son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células de placenta CD200⁺ o HLA-G⁻ aisladas facilitan la formación de cuerpos de tipo embrionario en una población de células de placenta que comprenden las células de placenta aisladas, en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrionario. En otra realización específica, las células de placenta aisladas se aíslan de células de placenta que no son células madre o multipotentes. En otra realización específica, dichas células de placenta aisladas se aíslan de células de placenta que no presentan estos marcadores.

En otra realización, una población de células útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria es una población de células que comprende, *p. ej.*, está enriquecida para, células madre CD200⁺, HLA-G⁻. En una realización específica, dicha población es una población de células de placenta. En diversas realizaciones, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 60 % de células en dicha población de células son células de placenta CD200⁺, HLA-G⁻ aisladas. En ciertas realizaciones, al menos aproximadamente un 70 % de células en dicha población de células son células de placenta CD200⁺, HLA-G⁻ aisladas. En otras ciertas realizaciones, al menos aproximadamente un 90 %, un 95 %, o un 99 % de dichas células son células de placenta CD200⁺, HLA-G⁻ aisladas. En una realización específica de las poblaciones de células, dichas células de placenta CD200⁺, HLA-G⁻ aisladas también son CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células de placenta CD200⁺, HLA-G⁻ aisladas también son CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de placenta CD200⁺, HLA-G⁻ aisladas también son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización, dicha población de células produce uno o más cuerpos de tipo embrionario cuando se cultivan en condiciones que permitan la formación de cuerpos de tipo embrionario. En otra realización específica, dicha población de células se aísla células de placenta que no son células madre. En otra realización específica, dichas células de placenta CD200⁺, HLA-G⁻ aisladas se aíslan células de placenta que no presentan estos marcadores.

En otra realización, las células de placenta aisladas útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria son CD73⁺, CD105⁺, y CD200⁺. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son HLA-G⁻. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, y HLA-G⁻. En otra realización específica, las células de placenta CD73⁺, CD105⁺, y CD200⁺ aisladas facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrionario en una población de células de placenta que comprenden las células de placenta aisladas, cuando la población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrionario. En otra realización específica, las células de placenta aisladas se aíslan de células de placenta que no son las células de placenta aisladas. En otra realización específica, las células de placenta aisladas se aíslan de células de placenta que no presentan estos marcadores.

En otra realización, una población de células útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria es una población de células que comprende, *p. ej.*, que se enriquece para, células de placenta CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas. En diversas realizaciones, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 60 % de células en dicha población de células son células de placenta CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente un 70 % de dichas células en dicha población de células son células de placenta CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente un 90 %, un 95 %, o un 99 % de células en dicha población de células son células de placenta CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ aisladas. En una realización específica de dichas poblaciones, las células de placenta aisladas son HLA-G⁻. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son además CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son además CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son además CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, y HLA-G⁻. En otra realización específica, dicha población de células produce uno o más cuerpos de tipo embrionario cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrionario. En otra realización específica, dicha población de células de placenta se aísla de células de placenta que no son células madre. En otra realización específica, dicha población de células de placenta se aísla de células de placenta que no presentan estas características.

- En otras ciertas realizaciones, las células de placenta aisladas son una o más de CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁺, HLA-G⁻ o ABC-p⁺. En una realización específica, las células de placenta aisladas son CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, y OCT-4⁺. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺, y SH4⁺. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ y OCT-4⁺. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, HLA-G⁻, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son OCT-4⁺ y ABC-p⁺. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ y OCT-4⁺. En otra realización, las células de placenta aisladas son OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻, y SSEA4⁻. En una realización específica, dichas células de placenta OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻, y SSEA4⁻ aisladas son además CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, y SH4⁺. En otra realización, las células de placenta aisladas son OCT-4⁺ y CD34⁻, y cualquiera de SH3⁺ o SH4⁺. En otra realización, las células de placenta aisladas son CD34⁻ y cualquiera de CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺, o OCT-4⁺.
- En otra realización, las células de placenta aisladas útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria son CD200⁺ y OCT-4⁺. En una realización específica, las células de placenta aisladas son CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células de placenta aisladas son HLA-G⁻. En otra realización específica, dichas células de placenta CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas son CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de placenta CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas son CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de placenta CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻. En otra realización específica, las células de placenta CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas facilitan la producción de uno o más cuerpos de tipo embrionario por una población de células de placenta que comprende las células aisladas, cuando la población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrionario. En otra realización específica, dichas células de placenta CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas se aíslan de células de placenta que no son células madre. En otra realización específica, dichas células de placenta CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas se aíslan de células de placenta que no presentan estas características.
- En otra realización, una población de células útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria es una población de células que comprende, p. ej., que se enriquece para, células de placenta CD200⁺, OCT-4⁺. En diversas realizaciones, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 60 % de células en dicha población son dichas células de placenta CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente 70 % de dichas células are dichas células de placenta CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente un 80 %, un 90 %, un 95 %, o un 99 % de células en dicha población son dichas células de placenta CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas. En una realización específica de las poblaciones aisladas, dichas células de placenta CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas son además CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células de placenta CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas son además HLA-G⁻. En otra realización específica, dichas células de placenta CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas son además CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de placenta CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas son además CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻. En otra realización específica, la población de células produce uno o más cuerpos de tipo embrionario cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrionario. En otra realización específica, dicha población de células se aísla de células de placenta que no son dichas células de placenta CD200⁺, OCT-4⁺ aisladas. En otra realización específica, dicha población de células se aísla de células de placenta que no presentan estos marcadores.
- En otra realización, las células de placenta aisladas útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria son CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻. En otra realización específica, las células de placenta CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻ aisladas son además CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, las células de placenta CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas son además CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, las células de placenta CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas son además OCT-4⁺. En otra realización específica, las células de placenta CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas son además CD200⁺. En otra realización específica, las células de placenta CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas son además CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ y CD200⁺. En otra realización específica, las células de placenta CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas facilitan la formación de cuerpos de tipo embrionario en una población de células de placenta que comprenden dichas células, cuando la población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrionario. En otra realización específica, dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas se aíslan de células de placenta que no son las células de placenta CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas. En otra realización específica, dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ aisladas se aíslan de células de placenta que no presentan estos marcadores.
- En otra realización, una población de células útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria es una población de células que comprende, p. ej., que se enriquece para, células de placenta CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻ aisladas. En diversas realizaciones, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 60 % de células en dicha población de células son células de placenta CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻ aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente 70 % de células en dicha población de células son células de placenta CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻ aisladas. En otra realización,

al menos aproximadamente un 90 %, un 95 %, o un 99 % de células en dicha población de células son células de placenta CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻ aisladas. En una realización específica de las poblaciones que se han mencionado anteriormente, dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻ aisladas son además CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻ aisladas son además CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻ aisladas son además OCT-4⁺. En otra realización específica, dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻ aisladas son además CD200⁺. En otra realización específica, dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁻ aisladas son además CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ y CD200⁺. En otra realización específica, dicha población de células se aísla de células de placenta que no son CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ células de placenta. En otra realización específica, dicha población de células se aísla de células de placenta que no presentan estos marcadores.

En otra realización, las células de placenta aisladas útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria son CD73⁺ y CD105⁺ y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrionario en una población de células de placenta aisladas que comprenden dichas células CD73⁺, CD105⁺ cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrionario. En otra realización específica, dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺ aisladas son además CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺ aisladas son además CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺ aisladas son además OCT-4⁺. En otra realización específica, dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺ aisladas son además OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺ aisladas se aíslan de células de placenta que no son dichas células. En otra realización específica, dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺ aisladas se aíslan de células de placenta que no presentan estas características.

En otra realización, una población de células útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria es una población de células que comprende, *p. ej.*, que se enriquece para, células de placenta aisladas que son CD73⁺, CD105⁺ y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrionario en una población de células de placenta aisladas que comprenden dichas células cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrionario. En diversas realizaciones, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 60 % de células en dicha población de células son dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺ aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente un 70 % de células en dicha población de células son dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺ aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente un 90 %, un 95 %, o un 99 % de células en dicha población de células son dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺ aisladas. En una realización específica de las poblaciones que se han mencionado anteriormente, dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺ aisladas son además CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺ aisladas son además CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺ aisladas son además OCT-4⁺. En otra realización específica, dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺ aisladas son además CD200⁺. En otra realización específica, dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺ aisladas son además CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ y CD200⁺. En otra realización específica, dicha población de células se aísla de células de placenta que no son dichas células de placenta CD73⁺, CD105⁺ aisladas. En otra realización específica, dicha población de células se aísla de células de placenta que no presentan estos marcadores.

En otra realización, las células de placenta aisladas útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria son OCT-4⁺ y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrionario en una población de células de placenta aisladas que comprenden dichas células cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrionario. En una realización específica, dichas células de placenta OCT-4⁺ aisladas son además CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células de placenta OCT-4⁺ aisladas son además CD34⁻, CD38⁻, o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de placenta OCT-4⁺ aisladas son además CD200⁺. En otra realización específica, dichas células de placenta OCT-4⁺ aisladas son además CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻, y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de placenta OCT-4⁺ aisladas se aíslan de células de placenta que no son OCT-4⁺ células de placenta. En otra realización específica, dichas células de placenta OCT-4⁺ aisladas se aíslan de células de placenta que no presentan estas características.

En otra realización, una población de células útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria es una población de células que comprende, *p. ej.*, que se enriquece para, células de placenta aisladas que son OCT-4⁺ y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrionario en una población de células de placenta aisladas que comprenden dichas células cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrionario. En diversas realizaciones, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 60 % de células en dicha población de células son dichas células de placenta OCT-4⁺ aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente un 70 % de células en dicha población de células son dichas células de placenta OCT-4⁺ aisladas. En otra realización, al menos aproximadamente un 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de células en dicha población de células son dichas células de placenta OCT-4⁺ aisladas. En una realización específica de las poblaciones que se han mencionado anteriormente, dichas células de placenta OCT-4⁺ aisladas son además CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de placenta OCT-4⁺ aisladas son además CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas

células de placenta OCT-4⁺ aisladas son además CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células de placenta OCT-4⁺ aisladas son además CD200⁺. En otra realización específica, dichas células de placenta OCT-4⁺ aisladas son además CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻, y CD45⁻. En otra realización específica, dicha población de células se aísla de células de placenta que no son dichas células. En otra realización específica, dicha población de células se aísla de células de placenta que no presentan estos marcadores.

En otra realización, las células de placenta aisladas útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria son células de placenta HLA-A,B,C⁺, CD45⁻, CD133⁻ y CD34⁻ aisladas. En otra realización, una población de células útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria es una población de células que comprende células de placenta aisladas, en donde al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 99 % de células en dicha población de células aisladas son células de placenta HLA-A,B,C⁺, CD45⁻, CD133⁻ y CD34⁻ aisladas. En una realización específica, dicha célula de placenta aislada o población de células de placenta aisladas se aísla de células de placenta que no son células de placenta HLA-A,B,C⁺, CD45⁻, CD133⁻ y CD34⁻. En otra realización específica de cualquiera de las células de placenta que se describen en la presente memoria, dichas células de placenta aisladas son de origen no materno. En otra realización específica, dicha población de células de placenta aisladas están básicamente libres de componentes maternos; *p. ej.*, al menos aproximadamente un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 90 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 % o un 99 % de dichas células en dicha población de células de placenta aisladas son de origen no materno.

En otra realización, las células de placenta aisladas útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria son células de placenta CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻ y CD133⁻ aisladas. En otra realización, una población de células útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria es una población de células que comprende células de placenta aisladas, en donde al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 99 % de células en dicha población de células son células de placenta CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻ y CD133⁻ aisladas. En una realización específica, dichas células de placenta aisladas o población de células de placenta aisladas se aísla de células de placenta que no son dichas células de placenta aisladas. En otra realización específica, dichas células de placenta CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻ y CD133⁻ aisladas son de origen no materno, es decir, tienen el genotipo fetal. En otra realización específica, al menos aproximadamente un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 90 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 % o un 99 % de dichas células en dicha población de células de placenta aisladas, son de origen no materno. En otra realización específica, dichas células de placenta aisladas o población de células de placenta aisladas se aíslan de células de placenta que no presentan estas características.

En otra realización, las células de placenta aisladas útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria son células de placenta CD10⁻, CD33⁻, CD44⁺, CD45⁻, y CD117⁻ aisladas. En otra realización, una población de células útiles para los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria es una población de células que comprende, *p. ej.*, enriquecida para, células de placenta aisladas, en donde al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 99 % de células en dicha población de células son células de placenta CD10⁻, CD33⁻, CD44⁺, CD45⁻, y CD117⁻ aisladas. En una realización específica, dicha célula de placenta aislada o población de células de placenta aisladas se aísla de células de placenta que no son dichas células. En otra realización específica, dichas células de placenta aisladas son de origen no materno. En otra realización específica, al menos aproximadamente un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 90 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 % o un 99 % de dichas células en dicha población de células son de origen no materno. En otra realización específica, dicha célula de placenta aislada o población de células de placenta aisladas se aísla de células de placenta que no presentan estos marcadores.

En otra realización, las células de placenta aisladas útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria son células de placenta CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻, y CD117⁻ aisladas. En otra realización, una población de células útiles para los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria es una población de células que comprende, *p. ej.*, enriquecida para, células de placenta CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻, y CD117⁻ aisladas, en donde al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 99 % de células en dicha población son células de placenta CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻, y CD117⁻. En una realización específica, dichas células de placenta aisladas o población de células de placenta aisladas se aíslan de células de placenta que no son dichas células. En otra realización específica, dichas células de placenta aisladas son de origen no materno. En otra realización específica, al menos aproximadamente un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 90 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 % o un 99 % de dichas células en dicha población de células son de origen no materno. En otra realización específica, dichas células de placenta aisladas o población de células de placenta aisladas se aísla de células de placenta que no presentan estas características.

En otra realización, las células de placenta aisladas útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria son HLA A,B,C⁺, CD45⁻, CD34⁻, y CD133⁻, y son además CD10⁺, CD13⁺, CD38⁺, CD44⁺, CD90⁺,

5 CD105⁺, CD200⁺ y/o HLA-G⁻, y/o negativas para CD117. En otra realización, una población de células útiles en los métodos descritos en la presente memoria es una población de células que comprende células de placenta aisladas, en donde al menos aproximadamente un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 % o aproximadamente un 99 % de las células en dicha población son células de placenta aisladas que son HLA A,B,C⁺, CD45⁻, CD34⁻, CD133⁻, y que son además positivas para CD10, CD13, CD38, CD44, CD90, CD105, CD200, y/o negativas para CD117 y/o HLA-G. En una realización específica, dichas células de placenta aisladas o población de células de placenta aisladas se aíslan de células de placenta que no son dichas células. En otra realización específica, dichas células de placenta aisladas son de origen no materno. En otra realización específica, al menos aproximadamente un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 90 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 % o un 99 % de dichas células en dicha población de células son de origen no materno. En otra realización específica, dichas células de placenta aisladas o población de células de placenta aisladas se aíslan de células de placenta que no presentan estos marcadores.

15 En otra realización, las células de placenta aisladas útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria son células de placenta aisladas que son CD200⁺ y CD10⁺, tal como se determina mediante unión a anticuerpo, y CD117⁻, tal como se determina tanto mediante unión a anticuerpo como RT-PCR. En otra realización, las células de placenta aisladas útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria son células de placenta aisladas, p. ej., células madre de placenta o células multipotentes de placenta, que son CD10⁺, CD29⁻, CD54⁺, CD200⁺, HLA-G⁻, MHC de clase I⁺ y β-2-microglobulina⁺. En otra realización, las células de placenta aisladas útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria son células de placenta en donde la expresión de al menos un marcador celular es al menos dos veces más elevada que para una célula madre mesenquimal (p. ej., una célula madre mesenquimal obtenida a partir de médula ósea). En otra realización específica, dichas células de placenta aisladas son de origen no materno. En otra realización específica, al menos aproximadamente un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 90 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 % o un 99 % de dichas células en dicha población de células son de origen no materno.

25 En otra realización, las células de placenta aisladas útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria son células de placenta aisladas, p. ej., células madre de placenta o células multipotentes de placenta, que son una o más de CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD105⁺, CD106/VCAM⁺, CD144/VE-cadherina^{bajo}, CD184/CXCR4⁻, β2-microglobulina^{bajo}, MHC-I^{bajo}, MHC-II⁻, HLA-G^{bajo}, y/o PDL1^{bajo}. En una realización específica, las células de placenta aisladas son al menos CD29⁺ y CD54⁺. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son al menos CD44⁺ y CD106⁺. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son al menos CD29⁺.

35 En otra realización, una población de células útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria comprende células de placenta aisladas, y al menos un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 98 % o un 99 % de las células en dicha población de células son células de placenta aisladas que son una o más de CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62-E⁻, CD62-L⁻, CD62-P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD105⁺, CD106/VCAM⁺, CD144/VE-cadherina^{dim}, CD184/CXCR4⁻, β2-microglobulina^{dim}, HLA-I^{dim}, HLA-II⁻, HLA-G^{dim}, y/o PDL1^{dim}. En otra realización específica, al menos un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 98 % o un 99 % de las células en dicha población de células son CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62-E⁻, CD62-L⁻, CD62-P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD105⁺, CD106/VCAM⁺, CD144/VE-cadherina^{dim}, CD184/CXCR4⁻, β2-microglobulina^{dim}, MHC-I^{dim}, MHC-II⁻, HLA-G^{dim}, y PDL1^{dim}.

45 En otra realización, las células de placenta aisladas útiles en los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria son células de placenta aisladas que son una o más, o todas, de CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁺, y ABC-p⁺, donde ABC-p es una proteína transportadora de ABC específica de placenta (tamil conocida como proteína de resistencia a cáncer de mama (BCRP) y como proteína de resistencia a mitoxantrona (MXR)), en donde dichas células de placenta aisladas se obtienen mediante perfusión de una placenta de mamífero, p. ej., ser humano, que se ha drenado de sangre del cordón umbilical y perfundido para retirar sangre residual.

50 En otra realización específica de cualquiera de las realizaciones de células de placenta que se describen en la presente memoria, las células de placenta son negativas para expresión genética de telomerasa, negativas para actividad de telomerasa, o ambas. La expresión genética de telomerasa se puede detectar usando, p. ej., detección de ARN de telomerasa usando, p. ej., transferencias puntuales o transferencias por ranuras; o un ensayo de protocolo de amplificación de repetición de telómero (TRAP) (p. ej., kits de ensayo TRAPEZE® ELISA, fluorométrico o basado en gel de Millipore).

55 En otra realización específica de cualquiera de las realizaciones de células de placenta que se describen en la presente memoria, las células de placenta son positivas para vimentina, p. ej., al menos un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, o un 98 % de dichas células de placenta expresan vimentina. La vimentina se puede detectar, p. ej., mediante citometría de flujo usando uno o más anticuerpos para vimentina, p. ej., que están disponibles en Abcam; mediante tinción de fluorescencia *in situ*, o similares.

60 En otra realización específica of de cualquiera de las realizaciones de of células de placenta que se describen en la

presente memoria, las células de placenta no secretan cantidades detectables de gonadotropina coriónica humana (hCG). La gonadotropina coriónica humana se puede detectar, *p. ej.*, mediante ELISA o inmunofluorescencia usando, por ejemplo, anticuerpo HCG1 monoclonal hCG (Abcam), o anticuerpos policlonales anti-hCG (Abcam, Novus Biologicals).

5 En otra realización de cualquiera de las células de placenta aisladas que se describen en la presente memoria, una población de las células de placenta aisladas comprende células de placenta adherentes a plástico de cultivo de tejidos CD56⁺ que no son linfocitos citolíticos naturales. En una realización específica, la población comprende de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 27 % de dichas células de placenta CD56⁺ en dicha población de células de placenta aisladas, tal como se determina mediante citometría de flujo usando CD56-FITC (isotiocianato de fluoresceína). En otra realización específica, la población comprende de aproximadamente un 16 % a aproximadamente un 62 % de dichas células de placenta CD56⁺ en dicha población de células de placenta aisladas, tal como se determina mediante citometría de flujo usando CD56-APC (alofococianina).

10 En otra realización específica de cualquiera de las características que se han mencionado anteriormente, la expresión del marcador celular (*p. ej.*, grupo o de marcador de diferenciación o inmunogénico) se determina mediante citometría de flujo; en otra realización específica, la expresión del marcador se determina por RT-PCR.

15 En cualquiera de las realizaciones de las células de placenta adherentes, *p. ej.*, células madre placenta, y se describen en la presente memoria, en una realización específica, las células se han identificado adicionalmente como supresión de proliferación de células cancerosas o crecimiento tumoral. En cualquiera de las realizaciones de las células de placenta adherentes, *p. ej.*, células madre placenta, que se describen en la presente memoria, en una realización específica, las células suprimen de forma detectable la proliferación de células cancerosas o crecimiento tumoral, *p. ej.*, *in vitro*.

20 Cada una de las células de placenta aisladas adherentes o poblaciones de las mismas que se han mencionado anteriormente puede comprender células obtenidas y aisladas directamente a partir de una placenta de mamífero, o células 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 mismos. Las pluralidades sucesoras de células tumorales de las células de placenta adherentes aisladas que se han descrito anteriormente pueden comprender aproximadamente, 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 de placenta aisladas adherentes.

5.7.3. Composiciones Que Comprenden Medios Acondicionados con Célula de Placenta Adherente

30 En la presente memoria también se proporciona el uso de una composición que comprende linfocitos y polímeros naturales que comprenden linfocitos PINK CD56⁺ CD16⁻ CD3⁻, perfundido de placenta y/o perfundido de placenta, y además medio acondicionado, en donde dicha composición es supresora de tumor, o es eficaz en el tratamiento de cáncer o infección vírica. Las células de placenta adherentes como se describe en la Sección 5.6.2, que se ha mencionado anteriormente, células de perfundido de placenta y/o linfocitos citolíticos naturales, por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta se pueden usar para producir medio acondicionado que es supresor de células tumorales, anticáncer o antiviral, medio que comprende una o más biomoléculas secretadas o excretadas por las células que tienen un efecto supresor de célula tumoral, efecto contra el cáncer o efecto antiviral detectables. En diversas realizaciones, el medio acondicionado comprende medio en el que las células (*p. ej.*, células de placenta aisladas adherentes, células de perfundido de placenta, y/o linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos PINK) han crecido (es decir, se han cultivado) durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más días. En otras realizaciones, el medio acondicionado comprende medio en el que tales células han crecido hasta una confluencia de al menos un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, o una confluencia hasta un 100 %. El medio acondicionado de ese tipo se puede usar para soportar el cultivo de una población de células separadas, *p. ej.*, células de placenta, o células de otro tipo. En otra realización, el medio acondicionado que se proporciona en la presente memoria comprende medio en el que se han cultivado células de placenta aisladas adherentes, *p. ej.*, células madre placenta adherentes aisladas o células multipotentes adherentes aisladas, y otras células distintas a las células de placenta aisladas adherentes, *p. ej.*, células madre o células multipotentes no placentarias.

50 Un medio acondicionado de ese tipo se puede combinar con cualquiera de, o cualquier combinación de, perfundido de placenta, células de perfundido de placenta, y/o linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta, para formar una composición que es sucesora de células tumorales, anticáncer o antiviral. En ciertas realizaciones, la composición comprende menos de la mitad de medio acondicionado en volumen, *p. ej.*, aproximadamente, o menos de aproximadamente, un 50 %, un 45 %, un 40 %, un 35 %, un 30 %, un 25 %, un 20 %, un 15 %, un 10 %, un 5 %, un 4 %, un 3 %, un 2 %, o un 1 % en volumen.

55 Por lo tanto, en una realización, en la presente memoria se proporciona una composición que comprende medio de cultivo de un cultivo de células de placenta aisladas adherentes, en donde dichas células de placenta aisladas adherentes (a) se adhieren a un sustrato; y (b) son CD34⁺, CD10⁺ y CD105⁺; en donde dicha composición suprime el crecimiento o proliferación de células tumorales de forma detectable, o es un agente contra el cáncer o antiviral. En una realización específica, las células de placenta adherentes aisladas son CD34⁺, CD10⁺ y CD105⁺ tal como se

detecta mediante citometría de flujo. En una realización más específica, las células de placenta aisladas son CD34⁺, CD10⁺ y CD105⁺ adherentes son células madre placenta. En otra realización más específica, las células de placenta aisladas son CD34⁺, CD10⁺ y CD105⁺ son células de placenta adherentes multipotentes. En otra realización específica, las células de placenta aisladas son CD34⁺, CD10⁺ y CD105⁺ tienen el potencial de diferenciarse en células que tienen una característica de una célula neuronal, células que tienen una característica de una célula osteogénica, y/o células que tienen una característica de una célula condrogénica. En una realización más específica, las células de placenta aisladas son CD34⁺, CD10⁺ y CD105⁺ adherentes son además CD200⁺. En otra realización más específica, las células de placenta aisladas son CD34⁺, CD10⁺ y CD105⁺ adherentes son además CD90⁺ o CD45⁻, tal como se detecta mediante citometría de flujo. En otra realización más específica, las células de placenta aisladas son CD34⁺, CD10⁺ y CD105⁺ adherentes son además CD90⁺ y CD45⁻, tal como se detecta mediante citometría de flujo. En una realización más específica, las células de placenta adherentes CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ son además CD90⁺ o CD45⁻, tal como se detecta mediante citometría de flujo. En otra realización más específica, las células de placenta adherentes CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ son además CD90⁺ y CD45⁻, tal como se detecta mediante citometría de flujo. En otra realización más específica, las células de placenta adherentes CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD90⁺, CD45⁻ son además CD80⁻ y CD86⁻, tal como se detecta mediante citometría de flujo.

En otra realización, en la presente memoria se proporciona una composición que comprende medio de cultivo De un cultivo de células de placenta aisladas adherentes, en donde dichas células de placenta aisladas adherentes (a) se adhieren a un sustrato; y (b) expresan CD200 y no expresan HLA-G, o expresan CD73, CD105, y CD200, o expresan CD200 y OCT-4, o expresan CD73 y CD105, y no expresan HLA-G, o expresan CD73 y CD 105 y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrionario en una población de células de placenta que comprenden las células madre placenta cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrionario, o expresan OCT-4 y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrionario en una población de células de placenta que comprenden las células madre placenta cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrionario; en donde dicha composición suprime el crecimiento o proliferación de células tumorales de forma detectable, o es anticáncer o antiviral. En una realización específica, la composición comprende adicionalmente una pluralidad de dichas células adherentes de placenta aisladas. En otra realización específica, la composición comprende una pluralidad de células que no son de placenta. En una realización más específica, dichas células que no son de placenta comprenden células CD34⁺, p. ej., células precursoras hematopoyéticas, tales como células precursoras hematopoyéticas de sangre periférica, células precursoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical, o células precursoras hematopoyéticas de sangre de placenta. Las células que no son de placenta también pueden comprender células madre, tales como células madre mesenquimales, p. ej., células madre mesenquimales obtenidas a partir de médula ósea. Las células que no son de placenta también pueden ser uno o más tipos de células o líneas celulares de adulto. En otra realización específica, la composición comprende un agente antiproliferativo, p. ej., un anticuerpo anti-MIP-1 α o anti-MIP-1 β .

En una realización específica, el medio de cultivo acondicionado con una de las células o combinaciones de células que se han descrito anteriormente se obtiene a partir de una pluralidad de células de placenta aisladas adherentes co-cultivadas con una pluralidad de células tumorales a una proporción de aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, o aproximadamente 5:1 células de placenta aisladas adherentes con respecto a células tumorales. Por ejemplo, el medio de cultivo o sobrenadante acondicionado se puede obtener a partir de un cultivo que comprende aproximadamente 1×10^5 células de placenta aisladas adherentes, aproximadamente 1×10^6 células de placenta aisladas adherentes, aproximadamente 1×10^7 células de placenta aisladas adherentes, o aproximadamente 1×10^8 células de placenta aisladas adherentes, o más. En otra realización específica, el medio de cultivo o sobrenadante acondicionado se obtiene a partir de un co-cultivo que comprende de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 5×10^5 células de placenta aisladas adherentes y aproximadamente 1×10^5 células tumorales; de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 5×10^6 células de placenta aisladas adherentes y aproximadamente 1×10^6 células tumorales; de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 5×10^7 células de placenta aisladas adherentes y aproximadamente 1×10^7 células tumorales; o de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 5×10^8 células de placenta aisladas adherentes y aproximadamente 1×10^8 células tumorales.

En una realización específica, el medio acondicionado adecuado para su administración a un individuo de 70 kg comprende sobrenadante acondicionado con aproximadamente 70 millones de células madre placenta en aproximadamente 200 ml de medio de cultivo.

El medio acondicionado se puede condensar para preparar un producto de calidad farmacéutica administrable. Por ejemplo, el medio acondicionado se puede condensar a aproximadamente un 90 %, un 80 %, un 70 %, un 60 %, un 50 %, un 40 %, un 30 %, un 20 %, un 10 % o más mediante la eliminación de agua, p. ej., por evaporación, liofilización, o similares. En una realización específica, por ejemplo, 200 ml de medio acondicionado de aproximadamente 70 millones de células madre placenta se pueden condensar hasta un volumen de aproximadamente 180 ml, 160 ml, 140 ml, 120 ml, 100 ml, 80 ml, 60 ml, 40 ml, 20 ml o menos. El medio condicionado también se puede secar básicamente, p. ej., hasta un polvo, p. ej., por evaporación, liofilización o similares.

5.8. Conservación de Perfundido, Células de Perfundido de Placenta, y Linfocitos Citolíticos Naturales

El perfundido de placenta, *p. ej.*, perfundido que comprende células de placenta, o células de placenta, *p. ej.*, células de perfundido de placenta, linfocitos citolíticos naturales combinados, o linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos PINK, se puede conservar, es decir, colocar en condiciones que permitan un almacenamiento a largo plazo, o en condiciones que inhiban la muerte celular, *p. ej.*, mediante apoptosis o necrosis.

El perfundido de placenta se puede producir mediante pase de una composición de recogida de células a través de al menos una parte de la placenta, *p. ej.*, a través de la vasculatura de la placenta. La composición de recogida de células comprende uno o más compuestos que actúan para conservar las células contenidas dentro del perfundido. Una composición de recogida de células de placenta de ese tipo puede comprender un inhibidor de la apoptosis, inhibidor de necrosis y/o un perfluorocarbono portador de oxígeno, tal como se describe en la Publicación de Solicitud de Estados Unidos relacionada N.º 20070190042 (documento de Patente de Estados Unidos N.º 9.598.669).

En una realización, el perfundido o una población de células de placenta se recogen de una placenta de mamífero postparto, *p. ej.*, de ser humano, poniendo en contacto el perfundido o población de células con una composición de recogida de células que comprende un inhibidor de la apoptosis y un perfluorocarbono portador de oxígeno, en donde dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad que durante un periodo de tiempo suficiente como para reducir o prevenir la apoptosis en la población de células de placenta, *p. ej.*, células de placenta adherentes, por ejemplo, células madre de placenta o células multipotentes de placenta, en comparación con una población de células que no están en contacto con el inhibidor de la apoptosis. Por ejemplo, la placenta se puede perfundir con la composición de recogida de células, y las células de placenta, *p. ej.*, células de placenta nucleadas totales, se aíslan a partir de la misma. En una realización específica, el inhibidor de la apoptosis es un inhibidor de caspasa. En otra realización específica, dicho inhibidor de la apoptosis es un inhibidor de JNK. En una realización más específica, dicho inhibidor de JNK no modula la diferenciación o proliferación de células de placenta adherentes, *p. ej.*, células madre placenta adherentes o células multipotentes de placenta adherentes. En otra realización, la composición de recogida de células comprende dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono portador de oxígeno en fases separadas. En otra realización, la composición de recogida de células comprende dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono portador de oxígeno en una emulsión. En otra realización, la composición de recogida de células comprende adicionalmente un agente de emulsión, *p. ej.*, lecitina. En otra realización, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono están entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 25 °C en el momento de entrar en contacto con las células de placenta. En otra realización más específica, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarbono están entre aproximadamente 2 °C y 10 °C, o entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 5 °C, en el momento de entrar en contacto con las células de placenta. En otra realización más específica, dicho contacto se realiza durante el transporte de dicha población de células. En otra realización más específica, dicho contacto se realiza durante la congelación y descongelación de dicha población de células.

En otra realización, el perfundido de placenta y/o células de placenta se puede recoger y conservar poniendo en contacto el perfundido y/o células con un inhibidor de la apoptosis y un compuesto de conservación de órganos, en donde dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad que durante un periodo de tiempo suficiente como para reducir o prevenir la apoptosis de las células, en comparación con perfundido o células de placenta que no entran en contacto con el inhibidor de la apoptosis. En una realización específica, el compuesto de conservación de órganos es una solución UW (que se describe en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.798.824; También se conoce como VIASPAN™; véase también Southard *et al*, *Transplantation* 49 (2): 251-257(1990) o una solución que se describe en Stern *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.552.267. En otra realización, dicha composición de conservación de órganos es almidón de hidroxietilo, ácido lactobiónico, rafinosa, o una combinación de los mismos. En otra realización, la composición de recogida de células de placenta comprende adicionalmente un perfluorocarbono portador de oxígeno, ya sea en dos fases o como una emulsión.

En otra realización del método, células de placenta se ponen en contacto con una composición de recogida de células que comprende un inhibidor de la apoptosis y un perfluorocarbono portador de oxígeno, compuesto de conservación de órganos, o combinación de los mismos, durante la perfusión. En otra realización, las células de placenta se ponen en contacto con dicho compuesto de recogida de células después de la recogida mediante perfusión.

Generalmente, durante la recogida, enriquecimiento y aislamiento de las células de placenta, es preferible minimizar o eliminar el estrés celular debido a la hipoxia y estrés mecánico. Por lo tanto en otra realización del método, el perfundido de placenta o una población de células de placenta se expone a una condición hipóxica durante la recogida, enriquecimiento o alistamiento durante menos de seis horas durante dicha conservación, en donde una condición hipóxica es una concentración de oxígeno que es menor que la concentración de oxígeno en sangre normal. En una realización más específica, dicho perfundido o población de células de placenta se expone a dicha condición hipóxica durante menos de dos horas durante dicha conservación. En otra realización más específica, dicha población de células de placenta se expone a dicha condición hipóxica durante menos una hora, o menos de treinta minutos, o no se expone a una condición hipóxica, durante la recogida, enriquecimiento o aislamiento. En otra realización específica, dicha población de células de placenta no se expone a estrés por cizallamiento durante la

recogida, enriquecimiento o aislamiento.

Las células de placenta aisladas adherentes, o células de perfundido de placenta, que se proporcionan en la presente memoria se pueden crioconservar, *p. ej.*, en medio de crioconservación en recipientes pequeños, *p. ej.*, ampollas. El medio de crioconservación adecuado incluye, pero no se limita a, medio de cultivo que incluye, *p. ej.*, medio de crecimiento, o medio de congelación celular, por ejemplo medio de congelación celular disponible en el mercado, *p. ej.*, C2695, C2639 o C6039 (Sigma). El medio de crioconservación comprende preferiblemente DMSO (dimetilsulfóxido), a una concentración de, *p. ej.*, aproximadamente un 10 % (v/v). El medio de crioconservación puede comprender agentes adicionales, por ejemplo, metilcelulosa y/o glicerol. Las células de placenta se enfrían preferiblemente a aproximadamente 1 °C/min durante la crioconservación. Una temperatura de crioconservación preferible es de aproximadamente -80 °C a aproximadamente -180 °C, preferiblemente de aproximadamente -125 °C a aproximadamente -140 °C. Las células de placenta crioconservadas se pueden residir a nitrógeno líquido antes de la descongelación para su uso. En algunas realizaciones, por ejemplo, una vez que las ampollas han alcanzado aproximadamente -90 °C, se transfieren a una zona de almacenamiento de nitrógeno líquido. Las células crioconservadas preferiblemente se descongelan a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 37 °C.

5.9. Compuestos Inmunomoduladores

En ciertas realizaciones, los métodos de supresión tumoral, el tratamiento de individuos que tienen cáncer (*p. ej.*, un cáncer hematológico o tumor sólido), y el tratamiento de individuos que tienen una infección vírica, que se proporcionan en la presente memoria, comprenden poner en contacto las células tumorales, o administrar a dicho individuo, un compuesto inmunomodulador, o tratamiento previo de linfocitos citolíticos naturales de placenta que comprenden linfocitos PINK CD56⁺ CD16⁻ CD3⁻; con un compuesto inmunomodulador.

Los compuestos inmunomoduladores que se proporcionan en la presente memoria incluyen compuestos conocidos como IMiDs[®] (Celgene Corporation). Como se usa en la presente memoria y a menos que se indique de otro modo, la expresión "compuestos inmunomoduladores" may puede incluir ciertas moléculas orgánicas pequeñas que inhiben la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-6, MIP-1 α , MCP-1, GM-CSF, G-CSF, y COX-2 monocíticos inducida por LPS.

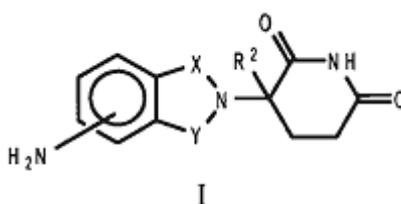
Los compuestos inmunomoduladores a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, N-[[2-(2,6-dioxo(3-piperidil)-1,3-dioxoisindolin-4-il)metil]ciclopropil-carboxamida; 3-[2-(2,6-dioxo-piperidin-3-il)-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-4-ilmetil]-1,1-dimetil-urea; (-)-3-(3,4-Dimetoxi-fenil)-3-(1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-propionamida; (+)-3-(3,4-Dimetoxi-fenil)-3-(1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-propionamida; (-)-{2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolin-1,3-diona}; (+)-{2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolin-1,3-diona}; difluoro-metoxi SelCIDs; 1-ftalimido-1-(3,4-dietoxifenil)etano; 3-(3,4-dimetoxifenil)-3-(3,5-dimetoxifenil)acrilonitrilo; 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina; 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina; 4-amino-2-(3-metil-2,6-dioxo-piperidin-3-il)-isoindolo-1,3-diona; 3-(3-acetoamidoftalimido)-3-(3-etoxi-4-metoxifenil)-N-hidroxi-propionamida; 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-metilisoindolina; Ciclopropil-N-2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]-3-oxoisindolin-4-il}carboxamida; 2-(3-hidroxi-2,6-dioxopiperidin-5-il)isoindolina sustituida; N-[2-(2,6-Dioxo-piperidin-3-il)-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-5-ilmetil]-4-trifluorometoxibenzamida; (S)-4-cloro-N-((2-(3-metil-2,6-dioxopiperidin-3-il)-1,3-dioxoisindolin-5-il)metil) benzamida; [2-[(3S)-3-metil-2,6-dioxopiperidin-3-il]-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-5-ilmetil]-amida del ácido piridin-2-carboxílico; (S)-N-((2-(3-metil-2,6-dioxopiperidin-3-il)-1,3-dioxoisindolin-5-il)metil)-4-(trifluorometil)benzamida; 3-(2,5-dimetil-4-oxo-4H-quinazolin-3-il)-piperidin-2,6-diona, y similares.

Los ejemplos específicos de compuestos inmunomoduladores incluyen derivados de ciano y carboxi de estirenos sustituidos tales como los que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.929.117; 1-oxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidin-3-il) isoindolinas y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidin-3-il) isoindolinas tales como las que se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.874.448 y 5.955.476; las tetra 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindolinas sustituidas que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.798.368; 1-oxo y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il) isoindolinas (*p. ej.*, derivados de 4-metilo de talidomida), 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il) ftalimididas sustituidas y 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindoles sustituidos que incluyen, pero no se limitan a, a los que se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.635.517, 6.281.230, 6.316.471, 6.403.613, 6.476.052 y 6.555.554; 1-oxo y 1,3-dioxoisindolinas sustituidas en la posición 4 o 5 del anillo de indolina (*p. ej.*, ácido 4-(4-amino-1,3-dioxoisindolin-2-il)-4-carbamoilbutanoico) que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.380.239; isoindolin-1-ona e isoindolin-1,3-diona sustituidas en la posición 2 con 2,6-dioxo-3-hidroxi-piperidin-5-ilo (*p. ej.*, 2-(2,6-dioxo-3-hidroxi-5-fluoropiperidin-5-il)-4-aminoisoindolin-1-ona) que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.458.810; una clase de amidas cíclicas no polipeptídicas que se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.698.579 y 5.877.200; y compuestos de isoindolo-imida tales como los que se describen en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 20030045552, el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.091.353, y en la Solicitud Internacional N.º PCT/US01/50401 (Publicación Internacional N.º WO 02/059106). La Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20060205787 describe composiciones de 4-amino-2-(3-metil-2,6-dioxopiperidin-3-il)-isoindolo-1,3-diona. La Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070049618 describe compuestos de isoindolo-imidas.

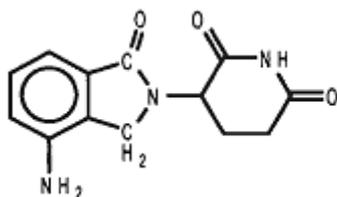
Diversos compuestos inmunomoduladores que se describen en la presente memoria contienen uno o más centros quirales, y pueden existir como mezclas racémicas de enantiómeros o mezclas de diastereómeros. La presente invención incluye el uso de formas estereoméricamente puras de tales compuestos, así como el uso de mezclas de esas formas. Por ejemplo, se pueden usar mezclas que comprenden cantidades iguales o diferentes de los enantiómeros de compuestos inmunomoduladores en particular. Estos isómeros se pueden sintetizar de forma asimétrica o se pueden resolver usando técnicas convencionales tales como columnas quirales o agentes de resolución quiral. (Véase, *p. ej.*, Jacques, J., *et al*, *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley-Interscience, New York, 1981); Wilen, S. H., *et al*, *Tetrahedron* 33: 2725 (1977); Eliel, E. L., *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGraw-Hill, NY, 1962); y Wilen, S. H., *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN, 1972)).

Los compuestos inmuno moduladores que se proporcionan en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, 1-oxo- y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)isoindolinas sustituidas con amino en el anillo benzo como se describe en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.635.517.

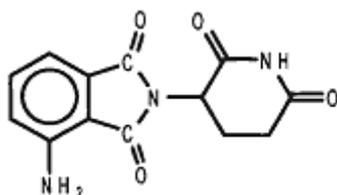
Estos compuestos tienen la estructura I:



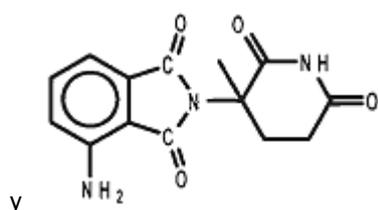
en la que uno de X e Y es C=O, el otro de X e Y es C=O o CH₂, y R² es hidrógeno o alquilo inferior, en particular metilo. Los compuestos inmunomoduladores específicos incluyen, pero no se limitan a:



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



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



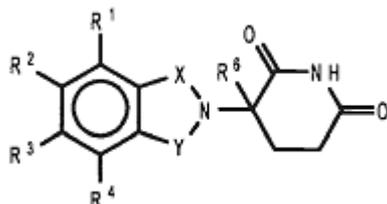
1,3-dioxo-2-(3-metil-2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-

aminoisoindol, e isómeros ópticamente puros de los mismos.

Los compuestos se pueden obtener a través de métodos de síntesis convencionales (véase *p. ej.*, el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.635.517. Los compuestos también están disponibles en Celgene Corporation, Warren, NJ.

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 los que se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 6.281.230; 6.316.471; 6.335.349; y 6.476.052, y en la Solicitud De Patente Internacional N.º PCT/US97/13375 (Publicación Internacional N.º WO 98/03502).

Los compuestos representativos tienen la fórmula:



en la que:

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

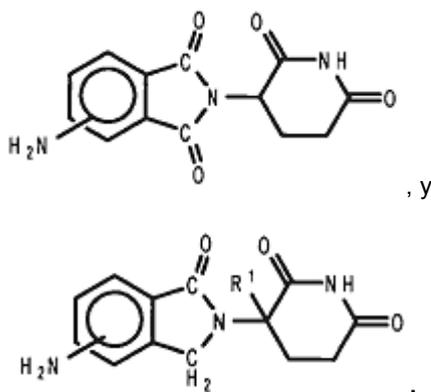
- 5 (i) cada uno de R¹, R², R³, y R⁴, independientemente de los otros, es halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono o (ii) uno de de R¹, R², R³, y R⁴ es -NHR⁵ y el resto de R¹, R², R³, y R⁴ son hidrógeno;

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

R⁶ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, bencilo, o halo;

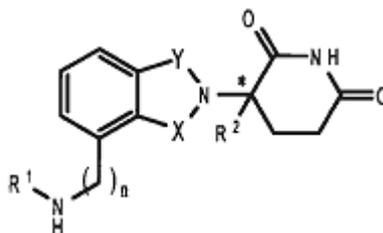
- 10 con la condición de que R⁶ sea distinto a hidrógeno si X e Y son C=O y (i) cada uno de R¹, R², R³, y R⁴ es fluoro o (ii) uno de R¹, R², R³, o R⁴ es amino.

La isquémica los compuestos representativos de esta clase son de las fórmulas:



- 15 en donde R¹ es hidrógeno o metilo. En una realización separada, la invención incluye el uso de formas enantioméricamente puras (p. ej. enantiómeros (R) o (S) ópticamente puros) de estos compuestos.

Además otros compuestos inmunomoduladores específicos que se describen en la presente memoria pertenecen a una clase de isoindolo-imidas que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.091.353, Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20030045552, y en la Solicitud Internacional N.º PCT/US01/50401 (Publicación de Solicitud Internacional N.º WO 02/059106). Los compuestos representativos tienen la fórmula II:



- 20 y sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, solvatos, clatratos, enantiómeros, diastereómeros, racematos, y mezclas de estereoisómeros de los mismos, en donde:

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

- 25 R¹ es H, alquilo (C₁-C₈), cicloalquilo (C₃-C₇), alqueno (C₂-C₈), alquino (C₂-C₈), bencilo, arilo, alquil (C₀-C₄)-heterocicloalquilo (C₁-C₆), alquil (C₀-C₄)-heteroarilo (C₂-C₅), C(O)R³, C(S)R³, C(O)OR⁴, alquil (C₁-C₈)-N(R⁶)₂, alquil (C₁-C₈)-OR⁵, alquil (C₁-C₈)-C(O)OR⁵, C(O)NHR³, C(S)NHR³, C(O)NR³R^{3'}, C(S)NR³R^{3'} o alquil (C₁-C₈)-O(CO)R⁵;

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

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, alquil (C₁-C₈)-OR⁵, alquil (C₁-C₈)-C(O)OR⁵, alquil (C₁-C₈)-O(CO)R⁵, o C(O)OR⁵;

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

R⁵ es alquilo (C₁-C₈), alquenilo (C₂-C₈), alquinilo (C₂-C₈), bencilo, arilo, o heteroarilo (C₂-C₅);

10 cada aparición de R⁶ es independientemente H, alquilo (C₁-C₈), alquenilo (C₂-C₈), alquinilo (C₂-C₈), bencilo, arilo, heteroarilo (C₂-C₅), o alquilo (C₀-C₈)-C(O)O-R⁵ o los grupos R⁶ se pueden unir para formar un grupo heterocicloalquilo;

n es 0 o 1; y

* representa un centro de carbono quiral.

15 En compuestos específicos de fórmula II, cuando n es 0 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, alquil (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;

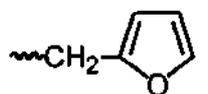
R² es H o alquilo (C₁-C₈); y

20 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; alquil (C₁-C₈)-OR⁵, alquil (C₁-C₈)-C(O)OR⁵, alquil (C₁-C₈)-O(CO)R⁵, o C(O)OR⁵; y las otras variables tienen las mismas definiciones.

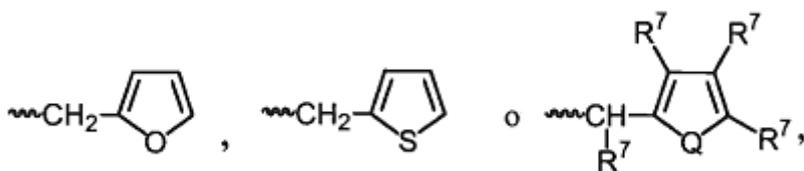
En otros compuestos específicos de fórmula II, R² es H o alquilo (C₁-C₄).

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



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



30 en donde Q es O o S, y cada aparición de R⁷ es independientemente H, alquilo (C₁-C₈), cicloalquilo (C₃-C₇), alquenilo (C₂-C₈), alquinilo (C₂-C₈), bencilo, arilo, halógeno, alquil (C₀-C₄)-heterocicloalquilo (C₁-C₆), alquil (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 apariciones adyacentes de R⁷ se pueden tomar en conjunto para formar un alquilo bicíclico o anillo de arilo.

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

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

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

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) se puede sustituir con alquilo (C₁-C₄), arilo, o bencilo.

Los ejemplos adicionales de los compuestos en esta clase incluyen, pero no se limitan a: [2-(2,6-dioxo-piperidin-3-il)-

en donde:

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, 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;

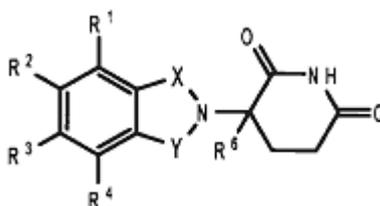
R⁶ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro, o flúor;

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

10 cada uno de R⁸ y R⁹ tomado independientemente del otro es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o R⁸ y R⁹ tomados en conjunto son tetrametileno, pentametileno, hexametileno, o -CH₂CH₂ X¹CH₂CH₂- en el que X¹ es -O-, -S- o -NH-; y

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

Otros compuestos representativos tienen la fórmula:



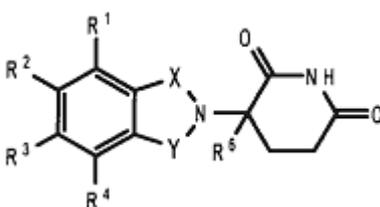
15 en la que

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

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

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

Otros compuestos representativos tienen la fórmula:



en la que:

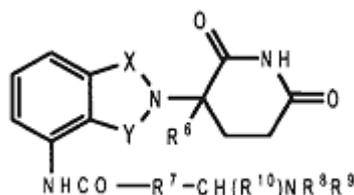
uno de X e Y es C=O y el otro de X e Y es C=O o CH₂;

25 (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, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o CO-R⁷-CH(R¹⁰)NR⁸R⁹ en que cada uno de R⁷, R⁸, R⁹, y R¹⁰ están cómo se define en la presente memoria; y

30 R⁶ es alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro, o flúor.

Los ejemplos específicos de los compuestos tienen la fórmula:



en la que:

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

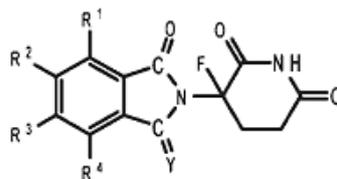
R⁶ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, bencilo, cloro, o flúor;

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

cada uno de R⁸ y R⁹ tomado independientemente del otro es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o R⁸ y R⁹ tomados en conjunto son tetrametileno, pentametileno, hexametileno, o -CH₂CH₂X¹CH₂CH₂- en el que X¹ es -O-, -S- o -NH-; y

R¹⁰ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o fenilo.

10 Otros compuestos inmunomoduladores específicos son 1-oxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidin-3-il) isoindolinas Y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidin-3-il) isoindolinas tales como las que se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos N.º 5.874.448 y 5.955.476. Los compuestos representativos tienen la fórmula:

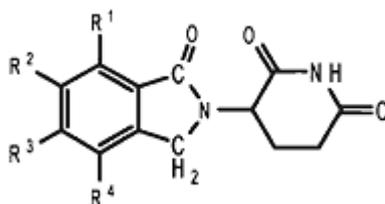


en donde:

15 Y es oxígeno o H₂ y

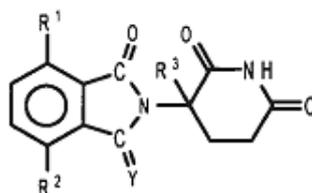
cada uno de R¹, R², R³, y R⁴, independientemente de los otros, es hidrógeno, halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, o amino.

20 Otros compuestos inmunomoduladores específicos son las 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisoindolinas tetra sustituidas que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.798.368. Los compuestos representativos tienen la fórmula:



en donde 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.

25 Otros compuestos inmunomoduladores específicos son las 1-oxo y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il) isoindolinas que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.403.613. Los compuestos representativos tienen la fórmula:



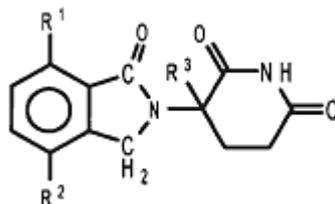
en la que

Y es oxígeno o H₂,

5 un primero de R¹ y R² es halo, alquilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, ciano, o carbamoilo, el segundo de R¹ y R², independientemente del primero, es hidrógeno, halo, alquilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, ciano, o carbamoilo, y

R³ es hidrógeno, alquilo, o bencilo.

Los ejemplos específicos de los compuestos tienen la fórmula:



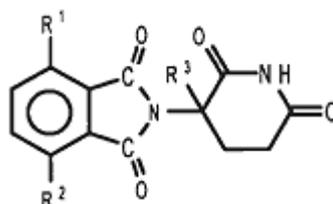
en donde

10 un primero de R¹ y R² es halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino en el que cada alquilo tiene de 1 a 4 átomos de carbono, ciano, o carbamoilo;

el segundo de R¹ y R², independientemente del primero, es hidrógeno, halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, alquilamino en el que alquilo tiene de 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino en el que cada alquilo tiene de 1 a 4 átomos de carbono, ciano, o carbamoilo; y

15 R³ es hidrógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o bencilo. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-metilisoindolina.

Otros compuestos representativos tienen la fórmula:



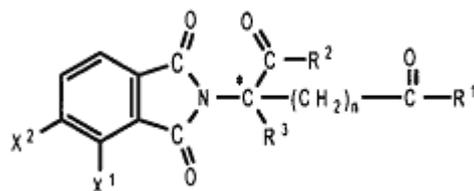
en donde:

20 un primero de R¹ y R² es halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino en el que cada alquilo tiene de 1 a 4 átomos de carbono, ciano, o carbamoilo;

el segundo de R¹ y R², independientemente del primero, es hidrógeno, halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, alquilamino en el que alquilo tiene de 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino en el que cada alquilo tiene de 1 a 4 átomos de carbono, ciano, o carbamoilo; y

25 R³ es hidrógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o bencilo.

Otros compuestos inmunomoduladores específicos que se describen en la presente memoria son 1-oxo y que 1,3-dioxoisoindolinas sustituidas en la posición 4 o 5 del anillo de indolina que se describen en e el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.380.239 y en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.244.759. Los compuestos representativos tienen la fórmula:

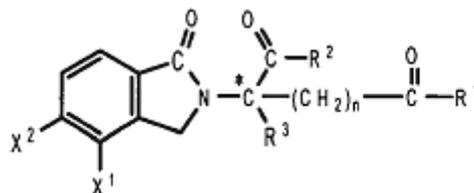


30 en el que el átomo de carbono designado como C* constituye un centro de quiralidad (cuando n no es cero y R¹ no

es el mismo que 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 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; con la condición de que si X¹ es amino, y n es 1 o 2, entonces R¹ y R² no son ambos hidroxilo; y las sales de los mismos.

5

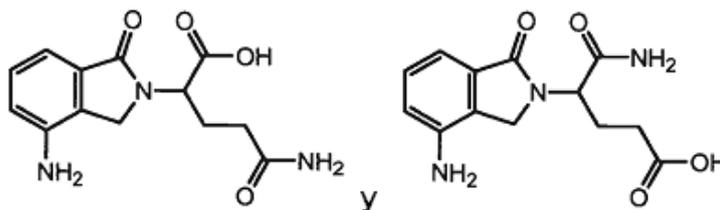
Los compuestos representativos adicionales tienen la fórmula:



en la que el átomo de carbono designado como 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 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 an alquilo o acilo de uno a seis carbonos; y n tiene un valor de 0, 1 o 2.

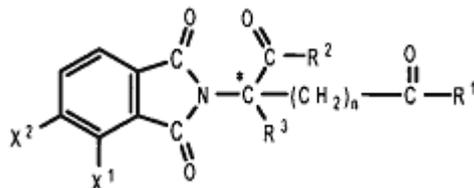
10

Los ejemplos específicos incluyen, pero 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 sales farmacéuticamente aceptables, solvatos, profármacos, y estereoisómeros de los mismos:



15

Otros compuestos representativos tienen la fórmula:

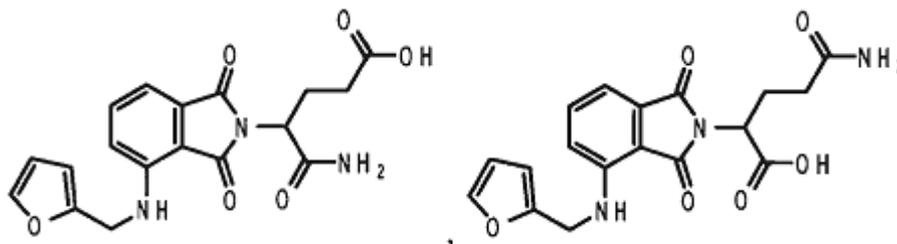


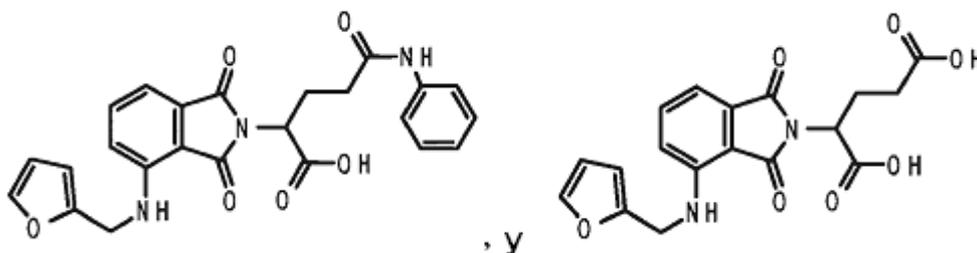
en la que el átomo de carbono designado como C* constituye un centro de quiralidad cuando n no es cero y R¹ no es R²; uno de X¹ y X² es amino, nitro, alquilo de uno a seis carbonos, o NH-Z, y el otro de X¹ o X² es hidrógeno; cada uno de R¹ y R² independientemente del otro, es hidroxilo o NH-Z; R³ es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

20

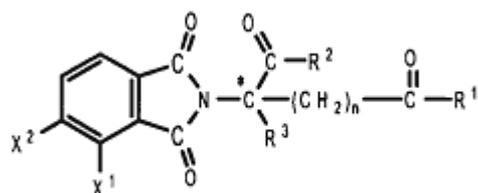
Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, ácido 4-carbamoil-4-{4-[(furan-2-il-metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il}-butírico, ácido 4-carbamoil-2-{4-[(furan-2-il-metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il}-butírico, ácido 2-{4-[(furan-2-il-metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il}-4-fenilcarbamoil-butírico, y ácido 2-{4-[(furan-2-il-metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il}-pentanodioico, que tienen las siguientes estructuras, respectivamente, y sales, solvato, profármacos, y estereoisómeros de los mismos farmacéuticamente aceptables;

25





Otros ejemplos específicos de los compuestos tienen la fórmula:



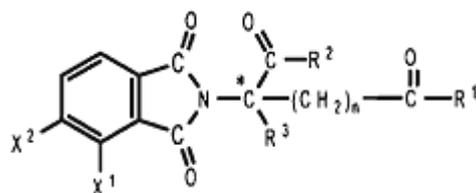
en donde:

- 5 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

- 10 n tiene un valor de 0, 1 o 2; y
 si -COR² y -(CH₂)_nCOR¹ son diferentes, el átomo de carbono que designa a C* constituye un centro de quiralidad.

Otros compuestos representativos tienen la fórmula:

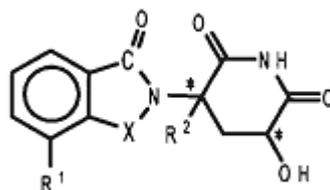


- 15 en donde:
 uno de X¹ y X² es alquilo de uno a seis carbonos;
 cada uno de R¹ y R², independientemente del otro, es hidroxilo o NH-Z;
 R³ es alquilo de uno a seis carbonos, halo, o hidrógeno;
 Z es hidrógeno, fenilo, un acilo de uno a seis carbonos, o un alquilo de uno a seis carbonos;

20 y

- n tiene un valor de 0, 1 o 2; y
 si -COR² y -(CH₂)_nCOR¹ son diferentes, el átomo de carbono que designa a C* constituye un centro de quiralidad.

- 25 Además otros compuestos inmunomoduladores específicos son isoindolin-1-ona e isoindolin-1,3-diona sustituidas en la posición 2 con 2,6-dioxo-3-hidroxipiperidin-5-ilo que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.458.810. Los compuestos representativos tienen la fórmula:



en donde:

los átomos de carbono designados con * constituyen centros de quiralidad;

X es -C(O)- o -CH₂-;

5 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,

alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, sin sustituir o sustituido con alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halo, amino, o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono,

10 cicloalquilo de 3 a 18 átomos de carbono,

fenilo, sin sustituir 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, sin sustituir 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 el que

15 R⁴ es hidrógeno,

alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, sin sustituir 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,

20 fenilo, sin sustituir 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, sin sustituir 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.

25 Todos los compuestos que se describen se pueden adquirir en el mercado o se pueden preparar según los métodos descritos en las patentes o publicaciones de patente que se describen en la presente memoria. Además, los compuestos ópticamente puros se pueden sintetizar por vía asimétrica o se pueden resolver usando agentes de resolución o columnas quirales conocidos así como otras técnicas convencionales de química orgánica de síntesis. La información adicional sobre compuestos inmunomoduladores, su preparación, y su uso se puede encontrar, por ejemplo, en las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.ºs 20060188475 (documento de Patente de Estados Unidos N.º 8.394.832), 20060205787, y 20070049618.

30 Los compuestos pueden ser moléculas orgánicas pequeñas que tienen un peso molecular inferior a 1.000 g/mol, y no son proteínas, péptidos, oligonucleótidos, oligosacáridos u otras macromoléculas.

35 Se debería indicar que si existe una discrepancia entre una estructura representada y un nombre dado a esa estructura, a la estructura representada se le debe conceder más peso. Además, si la estereoquímica de una estructura o una parte de una estructura no se indica con, por ejemplo, líneas en negrita o discontinuas, se debe interpretar que la estructura o parte de la estructura incluye todos los estereoisómeros de la misma.

40 Los compuestos inmunomoduladores se pueden adquirir en el mercado o se pueden preparar según los métodos descritos en las patentes o publicaciones de patente a las que se hace mención en la presente memoria. Además, las composiciones ópticamente puras se pueden sintetizar por vía asimétrica o se pueden resolver usando agentes de resolución o columnas quirales conocidos así como otras técnicas convencionales de química orgánica de síntesis. Los compuestos inmunomoduladores pueden ser racémicos, enriquecidos de forma estereomérica o estereoméricamente puros, y pueden incluir sales, solvatos, y profármacos de los mismos farmacéuticamente aceptables.

5.10. Administración de Linfocitos PINK, Perfundido de Placenta Humana, o Linfocitos Citolíticos Naturales

Combinados y un Compuesto Inmunomodulador

Los métodos de supresión tumoral, tratamiento de individuos que tienen cáncer (*p. ej.*, un cáncer hematológico o tumor sólido), y tratamiento de individuos que tienen una infección vírica, que se proporcionan en la presente memoria, comprenden poner en contacto las células tumorales, o administrar a dicho individuo, linfocitos citolíticos naturales que comprenden linfocitos PINK CD56⁺ CD16⁻ CD3⁻, linfocitos citolíticos naturales combinados, o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, los métodos de supresión y tratamiento tumoral además comprenden poner en contacto las células tumorales, o administrar al individuo un compuesto inmunomodulador o talidomida.

10 5.10.1. Tratamiento Previo de Linfocitos Citolíticos Naturales con Compuestos Inmunomoduladores o Talidomida

En una realización, los linfocitos citolíticos naturales que comprenden linfocitos PINK CD 56⁺ CD16⁻ CD3⁻, se ponen en contacto con un compuesto inmunomodulador o talidomida antes de la administración de células en conexión con los métodos que se presentan en la presente memoria. Por ejemplo, las células de ese tipo se pueden poner en contacto con un compuesto inmunomodulador o talidomida durante la expansión de los linfocitos citolíticos naturales. En ciertas realizaciones, la proliferación y/o citotoxicidad de los linfocitos citolíticos naturales se aumenta de forma detectable en comparación con los linfocitos citolíticos naturales que no se ponen en contacto con el compuesto inmunomodulador o talidomida. Los linfocitos citolíticos naturales se pueden poner en contacto con el compuesto inmunomodulador o talidomida a una concentración de aproximadamente 0,1 µM a aproximadamente 100 µM.

Los linfocitos citolíticos naturales aislados que comprenden linfocitos PINK CD 56⁺ CD16⁻ CD3⁻ o linfocitos citolíticos naturales combinados, tal como se describe en cualquier parte en la presente memoria, se pueden tratar con un compuesto inmunomodulador o talidomida, *p. ej.*, se ponen en contacto con un compuesto inmunomodulador o talidomida, para aumentar la actividad contra el cáncer o antitumoral de la célula, o para aumentar la actividad de la célula contra una infección vírica, *p. ej.*, contra células infectadas con virus. Por lo tanto, en la presente memoria se proporciona un método para aumentar la citotoxicidad de un linfocito citolítico natural a una célula tumoral que comprende poner en contacto el linfocito citolítico natural con un compuesto inmunomodulador o talidomida durante un periodo de tiempo y en una concentración suficiente como para que el linfocito citolítico natural demuestre un aumento de la citotoxicidad hacia una célula tumoral en comparación con un linfocito citolítico natural que no se pone en contacto con el compuesto inmunomodulador o talidomida. En otra realización, en la presente memoria se proporciona un método para aumentar la expresión de la granzima B o perforina en un linfocito citolítico natural que comprende poner en contacto el linfocito citolítico natural con un compuesto inmunomodulador o talidomida durante un periodo de tiempo y en una concentración suficiente como para que el linfocito citolítico natural demuestre un aumento de la expresión de la granzima B o perforina en comparación con un linfocito citolítico natural que no se pone en contacto con el compuesto inmunomodulador o talidomida. El compuesto inmunomodulador puede ser cualquier compuesto que se describe en la Sección 5.9, que se ha mencionado anteriormente, *p. ej.*, lenalidomida o pomalidomida.

En realizaciones específicas de lo mencionado anteriormente, los linfocitos citolíticos naturales comprenden linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta (linfocitos PINK) CD 56⁺ CD16⁻ CD3⁻. En otra realización específica de las realizaciones que se han mencionado anteriormente, los linfocitos citolíticos naturales se combinan con linfocitos citolíticos naturales, es decir, los linfocitos citolíticos naturales de perfundido de placenta y sangre del cordón umbilical emparejados.

En otra realización específica, dicha pluralidad de linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos PINK o linfocitos citolíticos naturales combinados, que se ponen en contacto con dicho compuesto inmunomodulador o talidomida expresan uno o más de BAX, CCL5, CCR5, CSF2, FAS, GUSB, IL2RA, o TNFRSF18 a un nivel más elevado que un número equivalente de dichos linfocitos citolíticos naturales que no se ponen en contacto con dicho compuesto inmunomodulador o talidomida. En otra realización específica, dicha pluralidad de linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos PINK, que se ponen en contacto con dicho compuesto inmunomodulador o talidomida 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 elevado que un número equivalente de dichos linfocitos citolíticos naturales que no se ponen en contacto con dicho compuesto inmunomodulador o talidomida.

En la presente memoria también se proporciona un método para aumentar la citotoxicidad de una población de células de perfundido de placenta humanas, *p. ej.*, células nucleadas totales de perfundido de placenta, hacia una pluralidad de células tumorales, que comprende poner en contacto las células de perfundido de placenta con un compuesto inmunomodulador o talidomida durante un periodo de tiempo y en una concentración suficiente como para que las células de perfundido de placenta demuestren un aumento de la citotoxicidad deseable hacia dicha pluralidad de células tumorales en comparación con un número equivalente de células de perfundido de placenta que no se ponen en contacto con el compuesto inmunomodulador o talidomida. En otra realización, en la presente memoria se proporciona un método para aumentar la expresión de granzima B en una población de células de

perfundido de placenta que comprende poner en contacto la población de células de perfundido de placenta con un compuesto inmunomodulador o talidomida durante un periodo de tiempo y en una concentración suficiente como para que la población de células de perfundido de placenta exprese un aumento detectable de la cantidad de granzima B en comparación con un número equivalente de células de perfundido de placenta que no se ponen en contacto el compuesto inmunomodulador o talidomida.

5.10.2. Administración de Células y Compuestos Inmunomoduladores o Talidomida

Las células y compuestos inmunomoduladores, como se ha descrito anteriormente, o talidomida, se pueden administrar a un individuo que tiene cáncer, *p. ej.*, una persona que tiene células tumorales, por ejemplo, una persona con un cáncer hematológico o un tumor sólido; o un individuo que tiene una infección vírica, para el tratamiento de dicho cáncer hematológico, tumor sólido, o infección vírica. En ciertas realizaciones, las células no se han puesto en contacto con un compuesto inmunomodulador antes de su uso, *p. ej.*, antes de la administración a dicho individuo en combinación con un compuesto inmunomodulador o talidomida. En otras ciertas realizaciones, las células se han puesto en contacto con un compuesto inmunomodulador antes de su uso, *p. ej.*, antes de su administración a dicho individuo en combinación con un compuesto inmunomodulador o talidomida.

En una realización, los linfocitos citolíticos naturales que comprenden linfocitos PINK CD 56⁺ CD16⁻ CD3⁻, y un compuesto inmunomodulador o talidomida se combinan, *p. ej.*, después de la expansión de linfocitos citolíticos naturales, o durante la formulación de los linfocitos citolíticos naturales para su administración a un individuo que tiene cáncer o una infección clínica. En otra realización, los linfocitos citolíticos naturales que comprenden dichos linfocitos PINK, y un compuesto inmunomodulador o talidomida se combinan inmediatamente antes de su administración a un individuo que tiene cáncer o una infección vírica, por ejemplo, en la instalación de puntos de cuidado en la que el individuo recibe tratamiento individual. En otra realización, los linfocitos citolíticos naturales que comprenden linfocitos PINK, y un compuesto inmunomodulador o talidomida se administran por separado a un individuo que tiene cáncer o una infección vírica, *p. ej.*, en diferentes formulaciones. En una realización específica, los linfocitos citolíticos naturales se pueden administrar al individuo antes de la administración del compuesto inmunomodulador o talidomida. En otra realización específica, descompuesto inmunomodulador o talidomida se administra al individuo después de la administración de los linfocitos citolíticos naturales al individuo. En otra realización específica, el compuesto inmunomodulador o talidomida y linfocitos citolíticos naturales se administran al mismo tiempo o aproximadamente al mismo tiempo.

En una realización específica, los métodos de tratamiento de un individuo que tiene células tumorales, un cáncer hematológico o un tumor sólido, *p. ej.*, un individuo que tiene cáncer, o un individuo que tiene una infección vírica, que comprende la administración de linfocitos citolíticos naturales, y opcionalmente un compuesto inmunomodulador o talidomida, comprende adicionalmente la administración al individuo de un compuesto inmunosupresor, *p. ej.*, ciclosporina; FK506; 2-acetil-4(5)-(1,2,3,4-tetrahidroxibutil)imidazol (THI); ciamexona; o similares. En ciertas realizaciones, el compuesto inmunosupresor es o comprende células de placenta adherentes (por ejemplo, las células madre placenta adherentes o células multipotentes que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.468.276 y en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2007/0275362 (documento de Patente de Estados Unidos N.º 8.057.788), o células madre mesenquimales, *p. ej.*, células madre mesenquimales obtenidas a partir de médula ósea.

Las células, *p. ej.*, linfocitos citolíticos naturales, por ejemplo, linfocitos PINK; células de perfundido de placenta humana; linfocitos citolíticos naturales combinados; poblaciones de células que comprenden las células de este tipo; o combinaciones de los mismos, y opcionalmente compuesto inmunomodulador o talidomida, se pueden administrar a un individuo de forma profiláctica. Por ejemplo, las células, y opcionalmente compuesto inmunomodulador o talidomida, como se ha descrito anteriormente, se pueden administrar a un individuo que presenta riesgo de desarrollar cáncer metastásico, por ejemplo, un individuo que tiene cáncer de mama, cáncer de próstata, mieloma múltiple, u otro tipo de cáncer que tiende a hacer metástasis, *p. ej.*, en hueso o tejido cerebral. La evidencia de metástasis, o la falta de la misma, no es un requisito previo necesario para el uso profiláctico de los compuestos inmunomoduladores o talidomida y las células.

Las células, *p. ej.*, linfocitos citolíticos naturales, por ejemplo, linfocitos PINK; células de perfundido de placenta humana; linfocitos citolíticos naturales combinados; poblaciones de células que comprenden las células de este tipo; o combinaciones de los mismos, y opcionalmente compuesto inmunomodulador o talidomida, se pueden administrar a un individuo, *p. ej.*, un individuo que tiene células tumorales o un individuo que tiene un cáncer hematológico o un tumor sólido, *p. ej.*, un paciente con cáncer, o un individuo que tiene una infección vírica, mediante cualquier vía de administración médicamente aceptable conocida en la técnica adecuada para la administración de células vivas. En diversas realizaciones, los linfocitos citolíticos naturales que comprenden linfocitos PINK CD 56⁺ CD16⁻ CD3⁻, se pueden implantar por vía quirúrgica, inyectar, infundir, *p. ej.*, por medio de un catéter o jeringa, o se pueden administrar de otro modo directa o indirectamente al sitio con necesidad de reparación o aumento. En una realización, dichos linfocitos citolíticos naturales se administran a dicho individuo; es decir, por vía intratumoral. En otra realización, dichos linfocitos citolíticos naturales, y opcionalmente compuesto inmunomodulador o talidomida, se administran al individuo en el sitio de un tumor, *p. ej.*, cualquier tumor sólido, por ejemplo, mediante inyección

- intratumoral. En realizaciones específicas, el tumor sólido es un tumor de cáncer de vejiga o un tumor de cáncer de hígado. En una realización específica en la que el individuo tiene un tumor en más de un sitio, las células, y opcionalmente compuesto inmunomodulador o talidomida, se administran a al menos dos, o todos, los sitios tumorales. En ciertas organizaciones, los linfocitos citolíticos naturales aislados que comprende dichos linfocitos PINK se administran por vía oral, por vía nasal, por vía intraarterial, por vía parenteral, por vía oftálmica, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intracerebral, por vía intraventricular, por vía intracerebroventricular, por vía intratecal, por vía intracisternal, por vía intraespinal o por vía periespinal. En ciertas realizaciones específicas, linfocitos citolíticos naturales se administran mediante agujas y/o catéteres intracraneales o intravertebrales con o sin dispositivos de bomba.
- 5 Los linfocitos citolíticos naturales, *p. ej.*, linfocitos PINK, células de perfundido de placenta humana, linfocitos citolíticos naturales combinados, o combinaciones de los mismos, o poblaciones de células que comprenden las células de ese tipo, y opcionalmente compuesto inmunomodulador o talidomida, se pueden administrar a un individuo en una composición, *p. ej.*, una matriz, hidrogel, armazón, o similares que comprenden las células.
- 10 En una realización, los linfocitos citolíticos naturales aislados que comprenden linfocitos PINK CD 56⁺ CD16⁻ CD3⁻, se siembran en una matriz natural, *p. ej.*, un biomaterial de placenta tal como un material de membrana amniótica. Un material de membrana amniótica de ese tipo puede ser, *p. ej.*, membrana amniótica diseccionada directamente a partir de la placenta de mamífero; membrana amniótica fijada o tratada con calor, membrana amniótica básicamente seca (es decir, < 20 % de H₂O), membrana coriónica, membrana coriónica básicamente seca, membrana amniótica y coriónica básicamente seca, y similares. Los biomateriales de placenta preferibles sobre los cuales se pueden sembrar las células madre placenta se describen en Hariri, Publicación de Solicitud de Estados Unidos N.º 2004/0048796.
- 15 En otra realización, los linfocitos citolíticos naturales que comprenden linfocitos PINK CD 56⁺ CD16⁻ CD3⁻, células de perfundido de placenta humana, linfocitos citolíticos naturales combinados, o combinaciones de los mismos, o poblaciones de células que comprenden las células de este tipo, se suspenden en una solución de hidrogel adecuada para, *p. ej.*, inyección. Los hidrogeles adecuados para las composiciones de ese tipo incluyen péptidos de autoensamblaje, tales como RAD16. En una realización, se puede permitir que una solución de hidrogel que comprende las células endurezca, por ejemplo en un molde, para formar una matriz que tiene células dispersas en la misma para su implante. Las células en una matriz de ese tipo también se pueden cultivar de modo que las células se expandan de forma mitótica antes del implante. El hidrogel puede ser, por ejemplo, un polímero orgánico (natural o sintético) que se retícula mediante enlaces covalentes, iónicos, o de hidrógeno para crear una estructura de red cristalina abierta tridimensional que atrapa moléculas de agua para formar un gel. Los materiales que forman hidrogel incluyen polisacáridos tales como alginato y sales de los mismos, péptidos, polifosfazinas, y que poliacrilatos, que se retícula por vía iónica, o polímeros de bloque tales como copolímeros de bloque de óxido de polietileno-polipropilenglicol se retícula con la temperatura o el pH, que se describen en la presente memoria respectivamente. En algunas realizaciones, el hidrogel o matriz que se describen en la presente memoria es biodegradable.
- 20 En algunos aspectos de la descripción, la formulación comprende un gel polimerizable *in situ* (véase, *p. ej.*, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2002/0022676; Anseth *et al.*, *J. Control Release*, 78 (1-3): 199-209 (2002); Wang *et al.*, *Biomaterials*, 24 (22): 3969-80 (2003).
- 25 En algunas realizaciones, los polímeros son al menos parcialmente solubles en soluciones acuosas, tales como agua, soluciones salinas tamponadas, o soluciones de alcohol acuosas, que tienen grupos laterales con carga, o una sal iónica monovalente de los mismos. Los ejemplos de polímeros que tienen grupos laterales ácidos que pueden reaccionar con cationes son poli(fosfazenos), poli(ácidos acrílicos), poli(ácidos metacrílicos), copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, acetato de polivinilo), y polímeros sulfonados, tales como poliestireno sulfonado.
- 30 También se pueden usar copolímeros que tienen grupos laterales ácidos formados por reacción de ácido acrílico o metacrílico y monómeros copolímeros de vinil éter. Los ejemplos de grupos ácidos son grupos ácido carboxílico, grupos ácido sulfónico, grupos alcohol halogenado (preferiblemente fluorados), grupos OH fenólico, y grupos OH ácido.
- 35 Las células madre placenta o co-cultivos de las mismas se pueden sembrar en un marco o armazón tridimensional y se pueden implantar *in vivo*. UN marco de ese tipo se puede implantar en combinación con uno cualquiera o más factores de crecimiento, células, fármacos u otros componentes que estimulan la formación de tejido o que de otro modo aumenta no mejoran la práctica de la invención.
- 40 Los ejemplos de armazones que se pueden usar en la presente invención incluyen mallas no tejidas, espumas porosas, o péptidos de auto ensamblaje. Las mallas no tejidas se pueden formar usando fibras que consisten en un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (*p. ej.*, PGA/PLA) (VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N.J.). Como armazones también se pueden usar espumas, formadas por, *p. ej.*, copolímero de poli(ε-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), formadas mediante procesos tales como secado mediante congelación, o liofilización (véase, *p. ej.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.355.699).
- 45 Las células madre de placenta también se pueden sembrar sobre, o ponen en contacto con, un material cerámico

fisiológicamente aceptables que incluye, pero no se limita a, mono-, di-, tri-, alfa-tri-, beta-tri-, y tetra- fosfato de calcio, hidroxiapatita, fluoroapatitas, sulfatos de calcio, fluoruros de calcio, óxido de calcio, carbonatados de calcio, fosfatos de magnesio y calcio, vidrios biológicamente activos tales como BIOGLASS®, y mezclas de los mismos. Los materiales cerámicos biocompatibles porosos disponibles en el mercado en la actualidad incluyen SURGIBONE® (CanMedica Corp., Canadá), ENDOBON® (Merck Biomaterial France, Francia), CEROS® (Mathys, AG, Bettlach, Suiza), y productos para injerto de hueso con colágeno mineralizados tales como HEALOS™ (DePuy, Inc., Raynham, MA) and VITOSS®, RHAKOSS™, y CORTOSS® (Orthovita, Malvern, Pa.). El armazón puede ser una mezcla, combinación o compuesto de materiales naturales y/o sintéticos.

En otra realización, las células madre placenta se pueden sembrar sobre cómo poner en contacto, un fieltro, que puede estar, *p. ej.*, formado por un hilo de múltiples filamentos formado a partir de un material bioabsorbible Tal como PGA, PLA, PCL copolímeros o mezclas, o ácido hialurónico.

Las células madre placenta, en otra realización, se pueden sembrar sobre armazones de espuma que pueden ser estructuras compuestas. Tales armazones de espuma se pueden moldear dándoles una forma útil, tal como la de una parte de una estructura específica en el cuerpo que se va a reparar, reemplazar o aumentar. En algunas realizaciones, el armazón se trata, *p. ej.*, con ácido acético 0,1 M seguido de incubación en polilisina, PBS, y/o colágeno, antes de la inoculación de las células de la descripción con el fin de aumentar la unión celular. Las superficies externas de una matriz se puede modificar para mejorar la unión o crecimiento de células y diferenciación de tejido, tal, mediante revestimiento de la matriz con plasma, o adición de una o más proteínas (*p. ej.*, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glucosaminoglicanos (*p. ej.*, sulfato de heparina, 4-sulfato de condroitina, 6-sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, sulfato de queratina, *etc.*), una matriz celular, y/u otros materiales tales como, pero que no se limitan a, gelatina, alginatos, goma de agar, agarosa, y gomas de plantas, y similares.

En algunas realizaciones, el armazón comprende, o se trata con, materiales que hacen que sea no trombofénico. Estos tratamientos materiales tan bien pueden estimular y mantener el crecimiento endotelial, migración, y deposición de matriz extracelular. Los ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, pero no se limitan a, materiales naturales tales como proteínas de la membrana basal tales como laminina y colágeno de Tipo IV, materiales sintéticos tales como EPTFE, y siliconas de poliuretano segmentadas, tales como PURSPAN (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif.). El armazón también puede comprender agentes anti-trombóticos tales como heparina; los armazones también se pueden tratar para alterar la carga superficial (*p. ej.*, revestimiento con plasma) antes de la siembra con células madre placenta.

5.10.3. Administración de Compuestos Inmunomoduladores o Talidomida

En ciertas realizaciones en las que los compuestos inmunomoduladores o talidomida se administran a un individuo que tiene células tumorales, *p. ej.*, cáncer, por ejemplo, un cáncer hematológico o un tumor sólido; o un individuo que tiene una infección vírica, el compuesto inmunomodulador o talidomida se puede, como se ha indicado anteriormente, administrar por separado, y por lo tanto se puede formular por separado, de las células.

Se puede usar cualquier vía de administración. Por ejemplo, un compuesto inmunomodulador o talidomida se puede administrar por vía oral, parenteral, intravenosa, transdérmica, intramuscular, rectal, sublingual, mucosal, nasal, u otros medios. Además, un compuesto inmunomodulador o talidomida se puede administrar en una forma de composición farmacéutica y/o forma de dosificación unitaria. Las formas de dosificación adecuadas incluyen, pero no se limitan, cápsulas, comprimidos (incluyendo comprimidos de disolución rápida y de liberación retardada), polvo, jarabes, suspensiones y soluciones orales para administración parenteral. Los métodos de administración adecuados para compuestos inmunomoduladores o talidomida, así como formas de dosificación y composiciones farmacéuticas adecuadas, se pueden encontrar en las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.ºs 20060188475 (documento de Patente de Estados Unidos N.º 8.394.832), 20060205787, y 20070049618.

Las formas de dosificación habituales comprenden un compuesto inmunomodulador o talidomida, o una sal, solvato, estereoisómero, o profármaco de los mismos farmacéuticamente aceptable, en una cantidad de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 150 mg. En particular, las formas de dosificación comprenden un compuesto inmunomodulador o talidomida, o una sal, solvato, estereoisómero, o profármaco de los mismos farmacéuticamente aceptable, en una cantidad de aproximadamente 0,001, 0,01, 0,1, 1, 2, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 25, 50, 100, 150 o 200 mg. En una realización particular, una forma de dosificación comprende 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona en una cantidad de aproximadamente 0,001, 0,01, 0,1, 1, 2, 5, 10, 25 o 50 mg.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto inmunomodulador o talidomida también pueden contener uno de o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Véase, *p. ej.*, Rowe *et al.*, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4ª Ed. (2003).

En una realización específica, una forma de dosificación comprende 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidin-2,6-diona en una cantidad de aproximadamente 0,001, 0,01, 0,1, 1,5, 10, 25 o 50 mg. Las formas de dosificación individual comprenden el segundo principio activo en una cantidad de 1 µg a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente

350 mg, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 200 mg. La presente invención también incluye el uso de mezcla racémica, isómero (S), el isómero (R) de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidin-2,6-diona. Por lo general, la 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidin-2,6-diona racémica se puede administrar en una cantidad de 1, 5, 10, 15, 25, o 50 mg al día. Los isómeros ópticos también se deben administrar en una cantidad comparable a la de la mezcla racémica. Las dosis se puedan ajustar dependiendo del tipo de enfermedad o trastorno que se va a tratar, prevenir o gestionar, y la cantidad de un compuesto inmunomodulador o talidomida y cualquier agente adicional opcional que se administre de forma simultánea al paciente, todos los cuales están dentro del alcance de la técnica.

6. Ejemplos

6.1. Ejemplo 1: Caracterización de Linfocitos Citolíticos Naturales Intermedios Obtenidos a Partir de Placenta de Perfundido de Placenta y Sangre del Cordón Umbilical

El presente ejemplo demuestra el aislamiento y cultivo de linfocitos citolíticos naturales a partir de perfundido de placenta humana.

Aislamiento de linfocitos citolíticos naturales de placenta. Los linfocitos citolíticos naturales se aislaron a partir de 8 unidades de perfundido de placenta humana (HPP), y a partir de 4 unidades de sangre del cordón umbilical (UCB), usando microperlas conjugadas con CD56. El aislamiento de los linfocitos PINK se realizó mediante selección de perla magnética (Miltenyi Biotec). La placenta post parto se exsanguinó y se perfundió con aproximadamente 200 a aproximadamente 750 ml de solución de perfusión (solución para inyección de NaCl al 0,9 % de Calidad USP (N.º de Cat 68200-804, VWR). El perfundido sin procesar se recogió y se procesó para retirar eritrocitos. Las células mononucleares de HPP o UCB se lavaron una vez con tampón de clasificación celular activado por fluorescencia (FACS) (RPMI 1640, sin rojo fenol, más FBS al 5 %), a continuación se centrifugó a 1500 rpm durante 6 minutos. Se hizo el recuento del número de células, y el sedimento celular se volvió a suspender en 80 µl de tampón por 10⁷ células totales con 20 µl de Microperlas CD3 (N.º de Catálogo 130-050-101, Miltenyi). El sistema se mezcló bien y se incubó durante 15 minutos a 4-8 °C. Se añadieron 1-2 ml de tampón por 10⁷ células totales, y la mezcla a continuación se centrifugó a 300 g durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró completamente mediante pipeteo. El sedimento celular se volvió a suspender hasta 10⁸ células en 500 µl de tampón y se preparó para separación magnética. Una columna LS (Miltenyi Biotec) se puso en el campo magnético de un separador celular MIDIMACS™ (Miltenyi Biotec), se aplicaron 3 ml para aclarar la columna, y la suspensión de células/microperlas se aplicó a la columna. Las células CD3⁻ sin etiquetar, que pasaron a través de la columna y que podrían incluir linfocitos citolíticos naturales, se recogieron, junto con 2 x 3 ml de tampón de lavado. Se hizo el recuento de las células CD3⁻, se lavaron una vez, a continuación se tiñeron con MicroPerlas CD56 (N.º de Cat: 130-050-401, Miltenyi), y se separaron/aislaron usando el mismo protocolo que para la separación de microperlas CD3 que se ha descrito anteriormente. de ese modo se recogió una población de CD56⁺CD3⁻ y quedó lista para análisis adicional. El intervalo de porcentaje de linfocitos citolíticos naturales fue de 3,52 a 11,6 (media 6,04, promedio 5,22) en HPP, y de 1,06 a 8,44 en UCB (media: 3,42, promedio: 4,2). La selección de microperlas CD56 de linfocitos citolíticos naturales a partir de HPP produjo una población que era pura en aproximadamente un 80 %. Véase la FIG. 1. Entre la población de linfocitos citolíticos naturales CD56⁺, CD3⁻ completos, el intervalo de porcentaje de linfocitos citolíticos naturales CD56⁺, CD16⁻ (es decir, linfocitos PINK) fue de 56,6 a 87,2 (media 74,2, promedio 65,5) de HPP, y de 53,7 a 96,6 (media 72,8) de UCB. El intervalo de porcentaje de linfocitos citolíticos naturales CD56⁺, CD16⁺ fue de 12,8 a 43,3 (media 25,8, promedio 34,5) de HPP, y de 3,4 a 46,3 (media 27,3, promedio 33,4) para UCB.

En otros experimentos, los linfocitos citolíticos naturales se aislaron usando un kit de selección negativa magnética que se dirige a antígenos de superficie celular en células sanguíneas humanas (CD3, CD4, CD14, CD19, CD20, CD36, CD66b, CD123, HLA-DR, glicoforina A). Las unidades de HPP y UCB crioconservadas se descongelaron y se diluyeron a 1:1 con medio de descongelación (Medio 1640 de RPMI (N.º de Catálogo 22400, Gibco) más Suero Bovino Fetal al 20 %-Inactivado por Calor (N.º de Catálogo SH30070.03, Hyclone)) y se centrifugó a 1500 rpm durante 8 minutos. El sobrenadante se retiró y se aplicó un tratamiento con cloruro de amonio para agotar adicionalmente los eritrocitos; la unidad se volvió a suspender en aproximadamente 30 ml de tampón FACS enfriado con hielo (RPMI 1640, sin rojo fenol, más FBS al 5 %), y a continuación 60 ml de cloruro de amonio (N.º de Catálogo 07850, Stem Cell) se añadió, la solución se agitó en vórtice y a continuación se incubó en hielo durante 5 minutos. A continuación las células mononucleares se lavaron con tampón FACS 3 veces y a continuación se centrifugaron a 1500 rpm durante 8 minutos. Se hizo el recuento del número de células y el sedimento celular se volvió a suspender en 5 x 10⁷ células vivas/ml en Tampón RoboSep (N.º de Catálogo 20104, Stem Cell) más 0,1 mg/ml de solución de DNAasa I (N.º de Catálogo 07900, Stem Cell) que se añadió a la suspensión celular, se mezcló suavemente con pipeta y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente antes del aislamiento. Los grumos se retiraron de la suspensión celular mediante filtrado con filtro de nailon de malla de 40 µm (N.º de Catálogo 352340, BD Falcon) antes de proceder al aislamiento. El aislamiento se automatiza con el dispositivo RoboSep (N.º de Catálogo 20000, Stem Cell) y el programa "Human NK Negative Selection 19055 and high recovery" (adición de 50 µl/ml de cóctel, adición de 100 µl/ml de Micropartículas, incubación es de 10 y 5 minutos, separaciones durante 1 x 2,5 minutos) con el Kit de Enriquecimiento de Linfocitos NK Humanos EasySep Negative Selection y Micropartículas Magnéticas EasySep. De ese modo, una población de linfocitos CD56⁺CD3⁻ se recogió y se dejó lista para análisis

adicional.

Expansión de Linfocitos Citolíticos Naturales. En general, los linfocitos citolíticos naturales se expandieron como sigue a continuación. El medio de partida para cultivo de linfocitos citolíticos naturales se preparó basándose en una modificación de un protocolo que se describe 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 resumen, en medio de partida incluye IMDM (Invitrogen) con FCS al 10 % (Hyclone), que contiene los siguientes reactivos con una concentración final de 35 µg/ml de transferrina (Sigma-Aldrich), 5 µg/ml de insulina (Sigma-Aldrich), etanolamina 2×10^{-5} M (Sigma-Aldrich), 1 µg/ml de ácido oleico (Sigma-Aldrich), 1 µg/ml de ácido linoleico (Sigma-Aldrich), 0,2 µg/ml de ácido palmítico (Sigma-Aldrich), 2,5 µg/ml De BSA (Sigma-Aldrich) y 0,1 µg/ml de Fitohemaglutinina (PHA-P, Sigma-Aldrich). Los linfocitos NK CD56⁺CD3⁻ se volvieron a suspender a $2,5 \times 10^5$ células vivas/ml de medio de partida más 200 ui/ml de IL-2 (R&D Systems) en placa de 24 pocillos o matraz en T tratado con cultivo celular. Ambas líneas de células PBMC y K562 alogénicas (línea de células de leucemia mielógena crónica) tratadas con mitomicina C se añadieron al medio de partida como células alimentadoras, hasta una concentración final de 1×10^6 por ml. Los linfocitos NK se cultivaron durante 5-6 días a 37 °C en CO₂ al 5 %. Después de 5-6 días y a continuación cada 3-4 días se añadió un volumen igual de Medio de Mantenimiento (IMDM con FCS al 10 %, suero de AB Humano al 2 %, antibióticos, L-glutamina y 400 unidades de IL-2 por ml) al cultivo. Los linfocitos NK se cosecharon El Día 21.

Caracterización de Linfocitos Citolíticos Naturales Intermedios Obtenidos a Partir de Placenta. Los HPP y CB de donante emparejados se descongelaron, y las células se lavaron con tampón FACS (RPMI-1640 con FBS al 5 %). A continuación los linfocitos citolíticos naturales se enriquecieron con microperlas de CD56 usando el sistema de separación magnética ROBOSEP® (StemCell Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La población de linfocitos citolíticos naturales enriquecidos con CD56 se tiñó con los siguientes anticuerpos (BD Bioscience sino se indica de otro modo) para caracterización inmunofenotípica: anti-CD56 conjugado con PE-Cy-7, anti-CD3 APC Cy7, anti-CD16 FITC, anti-NKG2D APC, anti-NKp46 APC, anti-CD94 PE(R&D), anti-NKBI PE, y anti-KIR-NKAT2 PE, CD94, NKG2D y NKp46 son marcadores ausentes, o que muestran una expresión reducida, en los precursores de linfocitos NK pero que están presentes en linfocitos NK totalmente diferenciados. Véase Freud *et al.*, "Evidence for Discrete States of Human 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* Publicado en línea 3 de agosto de 2007; Walzer *et al.*, "Natural Killer Cells: From CD3⁻NKp46⁺ to Post-Genomics Meta-Analyses," *Curr. Opinion Immunol* 19: 365-372 (2007). Como se muestra en la Tabla 1, la expresión de KIR3DL1, KIR2DL2/L3, NKG2D, NKp46 y CD94 no era significativamente diferente entre una población de células CD56⁺ enriquecida de la población de células CD56⁺ de HPP y una población celular emparejadas con HLA de sangre del cordón umbilical (CB).

Tabla 1. Porcentaje de linfocitos NK que portan ciertas combinaciones de marcador. Media de 3 muestras.

	Media (%)		
	CB	HPP	valor p
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

6.2. Ejemplo 2: Caracterización de Linfocitos Citolíticos Naturales Intermedios Obtenidos a Partir de Placenta De Perfundido de Placenta y Sangre del Cordón Umbilical Combinados

Las células mononucleadas emparejadas por donante de sangre del cordón umbilical y perfundido de placenta (combinación) se mezclaron y se lavaron con tampón FACS (RPMI-1640 con FBS al 5 %) una vez y se caracterizaron de forma inmunofenotípica usando los anticuerpos que se indican en el listado de la Tabla 2 en un BD FACSCanto (BD Biosciences). Los datos se analizaron con el software Flow Jo (Tree Star).

Tabla 2: Listado de anticuerpos usados en caracterización inmunofenotípica.

Artículo	Proveedor	N.º de Cat
FITC anti-hu CD3	BD Bioscience	555332

Artículo	Proveedor	N.º de Cat
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 (2DL2/L3)	BD Bioscience	556071
PE anti-huNK1(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

5 *Caracterización inmunofenotípica de Linfocitos NK de Placenta Y Linfocitos NK de Sangre Periférica (PB).* Los linfocitos NK se pueden dividir en dos grupos principales: linfocitos NK CD56⁺CD16⁺, y linfocitos CD56⁺CD16⁻. Los linfocitos NK CD56⁺CD16⁺ tienen gránulos citolíticos abundantes y una expresión elevada de CD16, y por lo tanto son capaces de provocar citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC). Por el contrario los linfocitos NK CD56⁺CD16⁻, tienen muy pocos gránulos citolíticos, una expresión baja o ninguna de CD16, pero son capaces de producir citoquinas y quimioquinas después de su activación. Los linfocitos NK individuales presentan un repertorio diverso de receptores de activación y e inhibitorios, incluyendo los receptores similares a inmunoglobulina citolítica (KIRs, *p. ej.*, KIR3DL1, y KIR2DL2/3), receptores de citotoxicidad natural NCRs (*p. ej.*, NKp30, NKp44, y NKp46), receptores similares a lectina de linfocito citolítico (KLRs; *p. ej.*, CD94, NKG2D), 2B4 y CD226.

10 El análisis de FACS se realizó en linfocitos NK de placenta y linfocitos NK de sangre periférica usando los mAb conjugados con fluorescencia contra receptores de NK específicos. Entre los 11 subconjuntos de NK caracterizados, los números de células en siete de 11 subconjuntos de 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 una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre linfocitos NK de placenta y linfocitos NK de sangre periférica (que representaba una diferencia de un 64 %) (Tabla 3 A; véanse también las Tablas 3B y 3C).

15 Tabla 3A. Caracterización fenotípica de linfocitos NK CD3⁺CD56⁺ en 16 unidades de sangre del cordón umbilical y perfundido de placenta humana (combinación) emparejadas por donante combinado y 13 unidades de sangre periférica (PB). El % medio para las filas que comprenden CD3, CD56, y un tercer marcador representan el porcentaje de células CD3⁺CD56⁺ certamen expresan el tercer marcador. El ensayo t de dos muestras se usa para determinar si las medias de población son iguales en unidades de placenta y sangre periférica.

	Combinación (16 unidades)	PB (13 unidades)	

Marcadores de superficie	Media %	Media %	Valor P
CD3 ⁻ CD56 ⁺	2,2	2,4	0,728
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁻	60,9	21,4	0,000
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺	30,1	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

5 Las Tablas 3B y 3C muestran la caracterización fenotípica de linfocitos NK CD3⁻CD56⁺CD16⁻ y CD3⁻CD56⁺CD16⁺ en 16 unidades de sangre del cordón umbilical y perfundido de placenta humana (combinación) emparejadas por donante combinado y 13 unidades de sangre periférica (PB) en experimento separado. El % medio para las filas que comprenden CD3, CD56, CD16 y un cuarto marcador representan el porcentaje de células CD3⁻CD56⁺CD16⁺ o CD3⁻CD56⁺CD16⁻ que también expresan el cuarto marcador.

Tabla 3B.

	Combinación	PB	
Marcadores de superficie	Media %	Media %	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	0,941
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.

	Combinación	PB	
Marcadores de superficie	Media %	Media %	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

	Combinación	PB	
Marcadores de superficie	Media %	Media %	Valor P
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ 2B4 ⁺	31,2	6,1	0,008

5 Un 60,9 % de linfocitos NK de placenta son CD56⁺CD16⁻ (linfocitos citolíticos naturales intermedios obtenidos a partir de placenta (PINK)) mientras que solo un 21,4 % de linfocitos NK de sangre periférica son CD56⁺CD16⁻. Después de cultivo durante 21 días, el porcentaje de cuatro de 11 subconjuntos de NK (CD3⁺CD56⁺KIR2DL2/3⁺, CD3⁺CD56⁺NKp46⁺, CD3⁺CD56⁺NKp44⁺ y CD3⁺CD56⁺NKp30⁺) mostró una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre linfocitos NK de placenta y de sangre periférica (Tabla 4).

10 Tabla 4. Caracterización fenotípica de linfocitos NK cultivado durante 21 días obtenidos a partir de 12 unidades de sangre del cordón umbilical y perfundido de placenta humana (combinación) emparejadas por donante combinado y 9 unidades de sangre periférica (PB). El ensayo t de dos muestras se usa para determinar si las medias de población son iguales en unidades de combinación y sangre periférica.

	Combinación (16 unidades)	PB (13 unidades)	
Marcadores de superficie	Media %	Media %	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

Además, en un experimento separado, se determinó que, después de cultivo durante 21 días, los linfocitos NK de placenta y sangre periférica demostraron perfiles de citoquina únicos, en particular para IL-8, tal como se determina con el ensayo de Luminex (Tabla 5).

15 Tabla 5

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

20 *Formación de perfiles de MicroARN de Linfocitos NK de Placenta y Linfocitos NK de Sangre Periférica.* Los linfocitos NK aislados o expandidos se sometieron a preparación de microARN (miARN) usando un Kit de Aislamiento de miARN MIRVANA™ (Ambion, N.º de Cat 1560). Los linfocitos NK (de 0,5 a 1,5 x 10⁶ células) se interrumpieron en un tampón de lisis desnaturalizante. A continuación, las muestras se sometieron a extracción con fenol+cloroformo en ácido para aislar ARN altamente enriquecido de especies de ARN pequeño. Se añadió un 100 % de etanol para llevar las muestras a un 25 % de etanol. Cuando esta mezcla de lisado/etanol se pasó a través de un filtro de fibra de vidrio, los ARN grandes se inmovilizaron, y las especies de ARN pequeño se recogieron en el filtrado. La concentración de etanol del filtrado a continuación se aumentó hasta un 55 %, y la mezcla se pasó a través de un segundo filtro de fibra de vidrio en el que los ARN pequeños se llegaron a inmovilizar. Este ARN se lavó unas pocas veces, y se eluyó en una solución de baja fuerza iónica. La concentración y pureza de ARN pequeño recuperado se determinó midiendo su absorbancia a 260 y 280 nm.

Se encontró que los miARN eran únicos para linfocitos PINK como se muestra en la Tabla 6. Se encontró que un miARN, designado como hsa-miR-199b, era único para linfocitos NK de sangre periférica.

Tabla 6. Formación de perfiles de miARN para linfocitos PINK y linfocitos NK de PB mediante qRT-PCR.

ID del miARN	N.º de Registro en Sanger	Secuencia	SEQ ID NO
hsa-miR-100	MIMAT0000098	aaccgguagaucggaacuugug	1
hsa-miR-127	MIMAT0000446	ucggauccgucugagcuuggcu	2
hsa-miR-211	MIMAT0000268	uuccuuugucauccuucgcu	3
hsa-miR-302c	MIMAT0000717	uaagugcuuccauguuucagugg	4
hsa-miR-326	MIMAT0000756	ccucugggccuuccuccag	5
hsa-miR-337	MIMAT0000754	uccagcuccuauaugaugccuuu	6
hsa-miR-497	MIMAT0002820	cagcagcacacugugguuugu	7
hsa-miR-512-3p	MIMAT0002823	aagugcugucagcagagguc	8
hsa-miR-515-5p	MIMAT0002826	uucccaaaaagaaagcacuuucug	9
hsa-miR-517b	MIMAT0002857	ucgugcauccuuuagaguguu	10
hsa-miR-517c	MIMAT0002866	aucgugcauccuuuagagugu	11
hsa-miR-518a	MIMAT0002863	aaagcgcuuccuuugcugga	12
hsa-miR-518e	MIMAT0002861	aaagcgcuuccuucagagug	13
hsa-miR-519d	MIMAT0002853	caaagugccuccuuuagagug	14
hsa-miR-520 g	MIMAT0002858	acaagugcuuccuuuagagugu	15
hsa-miR-520h	MIMAT0002867	acaagugcuuccuuuagagu	16
hsa-miR-564	MIMAT0003228	aggcacggugucagcaggc	17
hsa-miR-566	MIMAT0003230	ggcgccugugauccaac	18
hsa-miR-618	MIMAT0003287	aaacucuacuuguccuucugagu	19
hsa-miR-99a	MIMAT0000097	aaccgguagaucggaacuugug	20

5 *Caracterización Inmunofenotípica de Linfocitos NK de Placenta Cultivados y Linfocitos NK No Cultivados.* Las propiedades generales de los linfocitos PINK cultivados se evaluaron mediante amplios estudios inmunofenotípicos y ensayos de citotoxicidad. Para determinar el fenotipo de los linfocitos NK expandidos, se analizó la expresión de receptores de NK (NKR) tales como KIRs, NKG2D, NKp46, NKp44 y 2B4. Los ensayos de citotoxicidad se realizaron mediante etiquetado de células tumorales (células K562) con PKH26 y a continuación co-cultivando con linfocitos PINK durante 4 horas. Desde el día 0 hasta el día 21 la expresión de NKG2D aumentó de un 60,9 % ± 4,8 % a un 86 % ± 17,4 % (valor p de 0,024); NKp46 aumentó de un 10,5 % ± 5,4 % a un 82,8 % ± 9,0 % (valor p de 0,00002); NKp44 aumentó de un 9,6 % ± 6,5 % a un 51,6 % ± 27,5 % (valor p de 0,022); y 2B4 disminuyó de un 13,0 % ± 7,1 % a un 0,65 % ± 0,5 % (valor p de 0,009 %) (Tabla 7). En estas condiciones de cultivo, los KIR inhibitorio es que incluían KIR3DL1 (receptor similar a inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, tres dominios, cola citoplasmática larga 1, un receptor inhibitorio) y KIR2DL2/L3 (receptor similar a inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, dos dominios, cola citoplasmática larga 2 y cola citoplasmática larga 3; receptores inhibitorios) permanecían sin afectar durante la expansión de 21 días. Los cambios en la expresión de los NKR se correlacionaron adicionalmente con un aumento notable de la actividad citolítica El Día 21 con respecto al día 14 contra células K562 (un 63 % ± 15 % con respecto a un 45 % ± 4 %, valor p de 0,0004). Estos hallazgos han conducido a la identificación de supuestos marcadores de linfocitos NK que se correlacionan bien con la actividad citotoxicidad de los linfocitos NK.

Tabla 7. Caracterización fenotípica de linfocitos PINK antes y después de cultivo de 21 días. La desviación típica (Desv típ) se calculó para medias de población para 5 donantes.

	Día 0		Día 21	
	Media %	Desv Típ	Media %	Desv Típ
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

	Día 0		Día 21	
	Media %	Desv Típ	Media %	Desv Típ
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

Formación de perfiles Proteómicos de Membrana de Linfocitos NK de Placenta Cultivados y Linfocitos NK de Sangre Periférica Cultivados mediante Tecnología de Inmovilización de Proteína Basada en Lípido y LC/MS de Retención Iónica Lineal. Purificación de Proteína de Membrana: Los linfocitos citolíticos naturales de placenta de perfundido de placenta y células de sangre del cordón umbilical combinados, y linfocitos NK de PB, cultivados 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)bencenosulfonilo (AEBSF), pepstatina la A, E-64, bestatina, leupeptina, y aprotinina, sin a agentes quelantes de metal) antes de la lisis celular. A continuación las células se sometieron a lisis mediante la adición de una solución de HCl 10 mM, sin detergentes, y se centrifugó durante 10 min a 400 g para sedimentar y retirar los núcleos. El sobrenadante post-nuclear se transfirió a un tubo de ultracentrifugación y se centrifugó en una ultracentrifugadora WX80 con rotor T-1270 (Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC) a 100.000 g durante 150 minutos generando un sedimento de proteína de membrana.

Generación, Inmovilización y Digestión de Proteoliposomas: El sedimento de proteína de membrana se lavó varias veces usando tampón NANOXIS® (Tris 10 mM, NaCl 300 mM, pH 8). El sedimento de proteína de membrana se suspendió en 1,5 ml de tampón NANOXIS® y a continuación se sometió a sonicación con inclinación usando un procesador ultrasónico VIBRA-CELL™ VC505 (Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT) durante 20 minutos en hielo. Tamaño de los proteoliposomas se determina mediante tinción con colorante FM1-43 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y visualización con microscopio de fluorescencia. La concentración de proteína de la suspensión de proteoliposomas se determinó mediante un ensayo de BCA (Thermo Scientific). A continuación los proteoliposomas se inyectaron en una Celda de Flujo LPI™ (Nanoxis AB, Gothenburg, Suecia) usando una punta de pipeta convencional y se permitió que se inmovilizara durante 1 hora. Después de la inmovilización, se realizó una serie de etapas de lavado y tripsina a 5 µg/ml (Princeton Separations, Adelphi, NJ) se inyectó directamente en la Celda de Flujo LPI™. El chip se incubó durante una noche a 37 °C. A continuación los péptidos tripticos se eluyeron desde el chip y a continuación se desalaron usando un cartucho Sep-Pak (Waters Corporation, Milford, MA).

Fraccionamiento de Intercambio Catiónico Fuerte (SCX): Los péptidos tripticos se reconstituyeron en una solución de ácido fórmico al 0,1 %/agua y se cargaron en una columna TOP-TIP™ de intercambio catiónico fuerte (SCX) (PolyLC, Columbia, MD), una punta de pipeta empaquetada con 30 µm de material de empaquetado SCX de polisulfato de aspartamida. Los péptidos se diluyeron desde la columna TOP-TIP™ de SCX usando un gradiente en etapas de tampón de formiato amónico, pH 2,8 (10 mM-500 mM). Cada fracción de SCX se secó usando un sistema de vacío con velocidad y se reconstituyó con acetonitrilo al 5 %, Ácido Fórmico al 0,1 % en preparación para análisis de LC/MS corriente abajo.

Análisis de LC/MS/MS de Trampa Iónica Lineal de LTO: Cada fracción de SCX se separó en una columna MAGIC C18 de 0,2 mm x 150 mm, 3 µm, 200 Å (Michrom Bioresources, Inc., Auburn, CA) que se puso en contacto con sus caras directamente a una fuente de ionización por electronebulización nanocapilar asistida por vacío de desolvatación axial (ADVANCE) (Michrom Bioresources, Inc.) usando un gradiente de 180 min (Tampón A: Agua, Ácido Fórmico al 0,1 %; Tampón B: Acetonitrilo, Ácido Fórmico al 0,1 %). La fuente ADVANCE consigue una sensibilidad que es comparable a la del nanoESI tradicionalmente se funciona a un caudal considerablemente más elevado de 3 µl/min. Los péptidos eluidos se analizaron en un espectrómetro de masas con trampa iónica lineal LTQ (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) que usó diez barridos de MS/MS dependientes de los datos siguiendo cada uno un espectro de masas de barrido completo.

Bioinformática: Seis filas RAW que corresponden a las 6 fracciones salinas que se recogieron para cada línea de célula tumoral (AML, CML) se buscaron como una sola búsqueda frente a la Base de Datos Humanos de IPI usando una implementación del algoritmo SEQUEST en una estación de trabajo SORCERER™ SOLO™ (Sage-N Research, San Jose, CA). Una tolerancia de masas del péptido de 1,2 amu se especificó, la oxidación de metionina se especificó como una modificación diferencial, y la carbamidometilación se especificó como una modificación estática.

Una implementación del software Scaffold of Trans-Proteomic Pipeline (TPP) se usó para clasificar y analizar los datos proteómicos de la membrana. Las proteínas se consideraron para análisis si se identificaban con una probabilidad de péptido de un 95 %, probabilidad de proteína de un 95 % y 1 péptido único. Las comparaciones entre conjuntos de datos proteómicos de la membrana se prepararon usando transcripciones Perl a medida que se desarrollaron en las instalaciones.

El análisis desveló la identificación de 8 proteínas de membrana de linfocitos NK de placenta cultivados que eran únicos con respecto a las proteínas de membrana identificadas a partir de linfocitos NK de sangre periférica. Véase la Tabla 8. Además, 8 de proteínas de membranas identificaron a partir de linfocitos NK de sangre periférica que eran únicos con respecto a los linfocitos NK de placenta cultivados. Véase la Tabla 8. Proteínas específicas para linfocitos PINK y linfocitos NK de sangre periférica.

Tabla 8.

PROTEÍNAS ESPECÍFICAS PARA LINFOCITOS NK DE PLACENTA	PROTEÍNAS ESPECÍFICAS PARA LINFOCITOS NK DE PB
Aminopeptidasa N	Precursor del receptor 4 de factor de crecimiento de fibroblastos
Apolipoproteína E	Proteína 1 similar a nucleótido 4 asociado a inmunidad
Proteína 1 de interacción con 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 de transglicosilasa D de mureína lítica unida a membrana
Precursor de glicoproteína GP49B de superficie de mastocitos	Proteína 8 relacionada con la proteína de unión a oxisterol
Receptor de rianodina 1	Precursor de perforina 1

6.3. Ejemplo 3: Citotoxicidad de Linfocitos Citolíticos Naturales Hacia Células Tumorales

Este ejemplo demuestra que linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta son citotóxicos hacia células tumorales. Los linfocitos PINK de HPP son citotóxicos para las células de leucemia mielógena aguda, como se demuestra en un ensayo de citotoxicidad y mediante análisis de Luminex de secreción de citoquinas de linfocitos NK.

En el ensayo de secreción de citoquinas, los linfocitos NK enriquecidos con microperlas CD56 de HPP se mezclaron con células de leucemia mielógena aguda KG-1a a una proporción de 1:1. Después de incubación durante 24 horas, el sobrenadante se recogió y se sometió a análisis Luminex de IFN- γ y secreción de GM-CSF. El aumento de los niveles de IFN- γ y GM-CSF se observó después de incubación durante 24 h de células HPP enriquecidas con CD56 con células KG-1a como se muestra en la FIG. 2.

Citotoxicidad de Linfocitos PINK

En un ensayo de citotoxicidad que usa linfocitos PINK, las células tumorales dianas etiquetaron con éster de succinimidilo de carboxifluorosceína (CFSE). El CFSE es una tinción vital que no es tóxica para las células, y se reparte entre pero las hermanas durante la división celular. A continuación las células se colocaron en placas de cultivo tisular con el fondo en U de 96 pocillos y se incubaron con linfocitos PINK CD56⁺CD16⁻ recién aislados a proporciones de efector-diana (E:T) de 20:1, 10:1, 5:1 y 1:1 en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 10 %. Después de un periodo de incubación de 4 horas, las células se cosecharon y se examinaron mediante citometría de flujo para la presencia de CFSE. El número de células diana recuperadas del cultivo sin linfocitos NK se usó como una referencia. La citotoxicidad se define como: $(1 - \text{CFSE}_{\text{muestra}} / \text{CFSE}_{\text{control}}) * 100 \%$. La citotoxicidad de células tumorales significativas se observó a la proporción de 20:1. Véase la FIG. 3.

Susceptibilidad de las Células Tumorales a Linfocitos PINK Cultivados

Ensayo de Liberación de Lactato Deshidrogenasa (LDH). El ensayo de liberación de LDH se realizó usando el kit de ensayo de citotoxicidad colorimétrico CYTOTOX 96® (Promega, N.º de Cat G1780). En este ensayo, los linfocitos NK cultivados, que comprenden una combinación de células CD56⁺CD16⁻ y células CD56⁺CD16⁺ obtenidas a partir de HPP/UCB emparejados, eran células efectoras, y las células tumorales eran células diana. Las células efectoras se colocaron en placas de cultivo tisular con fondos de U de 96 pocillos y se incubaron a diversas proporciones de efector-diana (E:T) en 100 μ l de RPMI 1640 sin rojo fenol (Invitrogen, N.º de Cat 11835-030) suplementado con suero AB humano al 2 % (Gemini, N.º de Cat 100-512). Los cultivos se incubaron durante 4 h a 37 °C en CO₂ al 5 %. Después de incubación, se transfirieron 50 μ l de sobrenadante a una placa de ensayo enzimático, la actividad de LDH se detectó tal como se proporciona por el fabricante, y la absorción se midió a 490 nm en un lector de ELISA

(Synergy HT, Biotek). El grado de citotoxicidad se calculó según la siguiente ecuación: % de Citotoxicidad = (Muestra - Efector Espontáneo - Diana Espontánea)/(Diana Máxima - Diana Espontánea)* 100.

- 5 Ciertos tipos tumorales pueden ser más sensibles a los linfocitos NK que otros. Para analizar la susceptibilidad de las células tumorales a linfocitos PINK cultivados, doce líneas de células tumorales diferentes, cocultivadas con linfocitos PINK, se analizaron en un ensayo de liberación de LDH. Las 12 líneas de células tumorales incluían leucemia mielógena crónica (CML) humana, linfoma, retinoblastoma (RB), y mieloma múltiple (MM) (Tabla 9). La citotoxicidad de los linfocitos NK se midió con el ensayo de liberación de LDH después de 4 horas de co-cultivo.

Tabla 9. Líneas de células tumorales de la ATCC

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 humano
HCT116	Carcinoma colorrectal humano
HT29	Adenocarcinoma colorrectal humano
U266	Mieloma múltiple humano

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

- 15 Tabla 10. Susceptibilidad diferencial de células tumorales con respecto a linfocitos PINK cultivados. El error típico de la media (E. T. M.) se calculó para citotoxicidad media de 3 donantes.

Línea Celular	% de Citotoxicidad	E.T.M
CCRF-CEM	7,6	1,2
KG-1	20,5	1,5
KG-1 a	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

Aumento de la Citotoxicidad de Linfocitos PINK Mediante Tratamiento con Lenalidomida y Pomalidomida

Aislamiento y purificación de ARN. Los linfocitos NK aislados o expandidos se sometieron a preparación de ARN usando el Kit RNAQUEOUS®-4PCR (Ambion, N.º de Cat AM1914). En resumen, los linfocitos NK (de 0,5 a 1,5 x 10⁶

células) se sometiera análisis en la solución de lisis de guanidinio. El lisado de la muestra a continuación se mezcló con una solución de etanol, y se aplicó a un filtro a base de sílice que se une de forma selectiva y cuantitativa al ARNm y a los ARN ribosómicos más largos; los ARN muy pequeños tales como el ARNt y el ARN 5S ribosómico no se unieron de forma cuantitativa. A continuación el filtro se lavó para retirar ADN residual, proteína, y otros contaminantes, y el ARN se eluyó en agua sin nucleasa que contenía una cantidad traza de EDTA para producir la quelación de metales pesados. El filtro de sílice se alojó en un cartucho pequeño que se ajusta en los tubos de microcentrifugadora sin RNasa suministrados con el kit. El lisado de la muestra, soluciones de lavado y solución de elución se movieron a través del filtro mediante centrifugación o presión de vacío. Después de la elución desde el filtro, el ARN se trató con la DNasa 1 ultrapura proporcionada con el kit para retirar cantidades traza de ADN. Por último, la DNasa y cationes divalentes se retiraron con un reactivo también proporcionado con el kit. La concentración y pureza del ARN recuperado se determina midiendo su absorbancia a 260 y 280 nm.

Análisis Cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR). El ARN aislado a continuación se puede usar para síntesis de ADNc usando Reactivos de Transcripción Inversa TAQMAN® (Applied Biosystems, N.º de Cat N8080234) seguido de análisis de PCR en tiempo real con el Sistema de PCR en Tiempo Real Rápido 7900HT usando la Matriz Inmune Humana (Applied Biosystems, N.º de Cat 4370573) y la Matriz de MicroARN Humana (Applied Biosystems, N.º de Cat 4384792).

La lenalidomida y la pomalidomida son análogos químicos de la talidomida con un aumento de las actividades contra el cáncer y antiinflamatorias. Para estudiar si la lenalidomida y la pomalidomida podrían aumentar la citotoxicidad de los linfocitos PINK, los linfocitos PINK cultivados *ex vivo* (día 19) se trataron previamente con lenalidomida o pomalidomida durante 24 horas seguido de co-cultivo con la línea HCT-116 de células de carcinoma colorrectal diana. Los tratados linfocitos NK con lenalidomida demostraron una citotoxicidad de un 42,1 % y los linfocitos NK tratados con pomalidomida mostraron una citotoxicidad de un 47,4 %, mientras que los linfocitos PINK sin tratar de control mostraron solamente una citotoxicidad de un 24,3 %.

Los análisis de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) y citometría de flujo mostraron que el aumento de la citotoxicidad de los linfocitos NK provocado por la pomalidomida estaba correlacionado con un aumento de la expresión genética de la granzima B (GZMB) (aumento de un 60 % ± 1,7 %) (Tabla 11) y un aumento del porcentaje de linfocitos NK positivos para GZMB (aumento de un 25 %). Además, la expresión de GM-CSF aumentó en linfocitos PINK tratados con lenalidomida (aumento de un 232 % ± 1,6 %) y tratados con pomalidomida (aumento de un 396 % ± 0,3 %) - (Tabla 11 A, 11B).

Tabla 11A, 11B. Análisis de qRT-PCT de linfocitos PINK cultivados tratados con lenalidomida y con pomalidomida en comparación con células sin tratar. 11A: índice de cambio de la expresión genética entre nuestras tratadas con lenalidomida y sin tratar con lenalidomida para genes que se presentan en el listado. El ensayo t emparejado se usa para determinar si los índices de cambio son iguales en las muestras tratadas y sin tratar con lenalidomida. 11B: en índice de cambio de la expresión genética entre muestras tratadas con pomalidomida y sin tratar con pomalidomida para 25 genes que se presentan en el listado. El ensayo t emparejado se usa para determinar si los índices de cambio son iguales en las muestras tratadas y sin tratar.

Tabla 11A

	Veh	Len.	Veh-desv típ	Len.-desv típ	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 a BCL2

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

CCR5 - receptor 5 de quimioquina (motivo C-C)

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

FAS - superfamilia del receptor deTNF, miembro 6

GUSB - β glucuronidasa β

IL2RA - receptor 2 de α interleuquina

	Veh	Len.	Veh-desv típ	Len.-desv típ	Valor P
TNFRSF18 - superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 18					

Tabla 11B

	Veh	Len.	Veh-desv típ	Len.-desv típ	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	0,07	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	0,07	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	0,07	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 a BCL2

CCL2 - ligando 2 de quimioquina (motivo C-C)

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

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

CCR5 - receptor 5 de quimioquina (motivo C-C)

CSF1 - factor 1 estimulante de colonias (macrófago)

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

ECE1 - enzima 1 convertidora de endotelina

FAS - superfamilia del receptor deTNF, miembro 6

GNLY - granulisina

GUSB - glucuronidasa β

GZMB - granzima B (granzima 2, serina esterasa 1 asociada a linfocitos T citotóxicos)

IL1A - α interleuquina 1

IL2RA - receptor α de interleuquina 2

IL8 - interleuquina 8

IL10- interleuquina 10

LTA - linfoxina α (superfamilia del TNF, miembro 1)

PRF1 - perforina 1 (proteína formadora de poros)

PTGS2 - prostaglandina-endoperoxido sintasa 2 (prostaglandina G/H sintasa y ciclooxigenasa)

SKI - homólogo del oncogén de virus de sarcoma v-ski (aviar)

TBX21 -T-caja 21

5 En un experimento separado, la secreción de perforina y granzima B de linfocitos NK de placenta cultivados durante 21 días tratados con pomalidomida o con lenalidomida se evaluó mediante ELISA. La secreción de ambas enzimas a partir de linfocitos NK cultivados durante 21 días tratados con IMiD aumento de fama significativa en comparación con las células tratadas con vehículo, lo que sugiere que los IMiD aumentan de forma significativa la actividad citolítica de los linfocitos NK cultivados aumentando la producción de perforina y granzima B. De forma específica, los linfocitos NK tratados con pomalidomida mostraron un aumento de un 121 % en la secreción de perforina y un aumento de un 69 % en la secreción de granzima B, y los linfocitos NK tratados con lenalidomida mostraron un aumento de un 86 % en la secreción de perforina y un aumento de un 113 % en la secreción de granzima B en comparación con los controles.

10 En otro experimento separado, el efecto de la pomalidomida y de la lenalidomida en la expresión de citoquina por linfocitos NK de placenta se evaluó. La secreción de GM-CSF y TNF- α se evaluó con Luminex usando un Kit de Anticuerpo Five-Plex. La secreción de GM-CSF y TNF- α de linfocitos NK cultivados tratados aumentó de forma significativa en comparación con las células tratadas con vehículo, lo que indica que la pomalidomida y la lenalidomida aumentan de forma significativa la actividad citolítica de los linfocitos NK cultivados aumentando la producción de GM-CSF y TNF- α . De forma específica, los linfocitos NK tratados con pomalidomida mostraron un aumento de un 357 % en la secreción de GM-CSF y un aumento de un 147 % en la secreción de TNF- α ; y los linfocitos NK tratados con lenalidomida mostraron un aumento de un 166 % en la secreción de GM-CSF y un aumento de un 76 % en la secreción de TNF- α en comparación con los controles.

20 *Citotoxicidad de Linfocitos Citolíticos Naturales Combinados*

25 En un ensayo de citotoxicidad separado, los linfocitos NK cultivados obtenidos a partir de sangre del cordón umbilical y perfundido de placenta de donante emparejados eran células efectoras, mientras que las células tumorales eran células diana. Las células tumorales se etiquetaron con PKH26 (Sigma-Aldrich N.º de Catálogo PKH26-GL) (véase, p. ej., Lee-MacAry *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 252 (1-2): 83-92 (2001)), que se inserta en la membrana plasmática celular debido a su resto alifático lipófilo, que a continuación se coloca en placas de cultivo tisular con fondo en forma de U de 96 pocillos y se incuban con linfocitos NK cultivados a diversas proporciones de efector-diana (E:T) en 200 μ l de RPMI 1640 suplementado con FBS al 10 %. Los cultivos se incubaron durante 4 h a 37 °C en CO₂ al 5 %. Después de incubación, las células se recogieron y se añadió TO-PRO-3 (Invitrogen N.º de Catálogo T3605), una tinción de ADN impermeable a la membrana, a cultivos a una concentración final de 1 μ M seguido de análisis de FACS usando BD FACSCanto. La citotoxicidad se expresó como porcentaje de células muertas (PKH26⁺TO-PRO-3⁺) dentro de las células tumorales diana PKH26⁺ totales.

30 En este ensayo de citotoxicidad, las células K562 de linfoma mielóide crónico (CML) humano se etiquetaron con PKH26, que se inserta en la membrana plasmática celular, y se colocaron en placas de cultivo tisular con fondo en forma de U de 96 pocillos. Los linfocitos NK de placenta (combinación) o sangre periférica cultivados durante 21 días se mezclaron con células K562 a proporciones de efector con respecto a diana (E:T) de 10:1, 5:1, 2.5:1 y 1.25:1 en RPMI 1640 suplementado con FBS al 10 % en v/v. Después de un periodo de incubación de 4 horas, las células se recogieron y se añadió TO-PRO-3 a cultivos celulares seguido de citometría de flujo para 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 PKH26⁺ totales. Tanto los linfocitos NK de placenta como los linfocitos NK de sangre periférica mostraron una toxicidad básica hacia células K562 a todas las proporciones E:T sometidas a ensayo (FIG. 4). En dos proporciones E:T, 10:1 y 5:1 (FIG. 4), se observó una toxicidad significativamente más elevada de linfocitos NK de placenta que de los linfocitos NK de sangre periférica hacia células K562.

6.4. Ejemplo 4: Citotoxicidad de Perfundido de Placenta Humana Hacia Células Tumorales

45 Este Ejemplo demuestra que las células de perfundido de placenta humana son citotóxicas las con respecto a las células tumorales, y que la citotoxicidad de las células nucleadas totales de HPP (TNC-HPP) en KG-1a era más elevada que la de TNC de UCB emparejadas. Las células nucleadas totales de HPP o sangre del cordón umbilical (UCB) se mezclaron con células KG-1a a proporciones de 1:1, 5:1, 10:1, 20:1 o 100:1. Después de 24 h o 48 h de incubación, las células se recogieron y se examinaron para la presencia de CFSE mediante análisis de FACS (BD FACSCanto, BD Bioscience). Las células tumorales cultivadas solas se usaron como controles. La citotoxicidad se definió como: $(1 - \text{CFSE}_{\text{muestra}} / \text{CFSE}_{\text{control}}) * 100$ %. A la proporción de 100:1 se observó una citotoxicidad significativa. Véase la FIG. 5.

En un experimento separado, la citotoxicidad de las células nucleadas totales de HPP se comparó con la de las células nucleadas totales de sangre del cordón umbilical. La TNC-HPP emparejada o UCB se mezcló con células KG-1a a 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 una citotoxicidad coherentemente más elevada en todas las proporciones comparadas con las de UCB. Véase la FIG. 6.

- 5 En otro experimento, 24 horas antes de la incubación con células KG-1a cells, TNC-HPP se estimuló con 100 U/ml, o 1000 U/ml de IL-2, mientras que HPP cultivado con medio RPMI se usó como control. A una proporción de 6,25 linfocitos NK por células KG-1a y superior, parece que IL-2 aumenta la citotoxicidad de TNC-HPP. Véase la FIG. 7.

Los experimentos se repitieron usando una matriz más amplia de tipos de células tumorales, como se muestra en la Tabla 12, usando 5×10^5 células HPP y 1×10^4 células tumorales.

Tabla 12: Tipos Célula Tumoral Sometidos a Ensayo para Efecto Citotóxicos de Perfundido de Placenta

HCC2218	Carcinoma ductal primario humano
CCRF-CEM	Leucemia humana
J.RT3-T3.5	Leucemia humana de linfocitos T aguda
K562	Linfoma mielóide crónico (CML) humano
KG-1	Leucemia humana mielógena aguda
KG-1a	Leucemia humana mielógena aguda (AML)
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 colorrectal humano
HT-29	Adenocarcinoma colorrectal humano
U266	Mieloma humano

- 10 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 una toxicidad básica hacia las células tumorales. Para ambos periodos de tiempo, el co-cultivo dio como resultado la muerte de más de un 50 % de las células tumorales. Véanse las FIGS. 8A y 8B.

15 6.5. Ejemplo 5: Producción de Citoquina por Células Perfundido de Placenta Humana Durante la Exposición a Células Tumorales

Para determinar el mecanismo primario de acción responsable de la mediación de los efectos anti-leucémicos potentes de las células HPP, el perfil de liberación de citoquinas de las células HPP cocultivadas con líneas de células tumorales se analizó, y se comparó con el de las células UCB, en diferentes momentos con el ensayo de Luminex multiplexado.

- 20 Los sobrenadantes recogidos después de la incubación se sometieron al ensayo de Luminex para determinar las concentraciones de IFN- γ , TNF- α , y GM-CSF (N.º de Cat HCYTO-60K-03, Millipore). Estas tres citoquinas están relacionadas con la citotoxicidad de NK. (Véase, *p. ej.*, Imai *et al.*, *Blood* 2005. 106 (1): 376-83.). La RT-PCR cuantitativa también se realizó para examinar la expresión de IFN- γ , TNF- α , y GM-CSF usando el instrumento FAST 7900HT y cebadores de Applied Biosystems. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que para los ensayos de citotoxicidad de co-cultivo que se han descrito anteriormente. Las concentraciones de citoquina se determinaron usando un ensayo de Luminex.

- 30 Se determinó que la secreción de IFN- γ , TNF- α , y GM-CSF de células HPP cocultivadas con células tumorales era significativamente más elevada que la de las células UCB. En un experimento, las células HPP se mezclaron con células KG-1a a 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 de IL-2. TNC-HPP mostró un aumento coherente de la producción de IFN- γ en presencia de IL-2 en comparación con la ausencia de IL-2. Los niveles de IFN- γ a las 24 h se determinaron para aumentar aproximadamente en 5-26 veces (media: 16 veces); a las 48 h aproximadamente 3~65 veces (media: 27 veces), que era coherente con los resultados del estudio de citotoxicidad. Véase la FIG. 9.

- 35 En otro experimento, 24 horas antes de la incubación con células KG-1a, TNC-HPP se estimuló con 100 U/ml, o 1000 U/ml de IL-2, mientras que las HPP cultivadas con RPMI se usaron como control. Las células HPP o UCB emparejadas se incubaron 24 h con o sin IL-2, antes de cocultivo con células KG-1a. La secreción de IFN- γ fue la que presentó el aumento más elevado en células HPP cocultivadas con K562 y KG-1a a las 48 h. Cuando las

células HPP se trataron con 100 U/ml de IL-2, la citotoxicidad de las células HPP en KG-1a a las 24 h y 48 h aumento. El nivel de secreción de IFN- γ en células HPP era más elevado que el de las células UCB emparejadas después de tratamiento con IL-2. La expresión más elevada de IFN- γ se confirmó mediante análisis de RT-PCR de células de HPP y UCB emparejadas. Estos resultados muestran que las células HPP presentan una actividad anti-leucémica más elevada en comparación con las células UCB y esta actividad más elevada está asociada con un aumento sin fricativo de la producción de IFN- γ .

La producción de IFN- γ en células HPP, y en células de sangre del cordón umbilical, durante el co-cultivo con un panel de líneas de células tumorales se analizó usando las líneas de células tumorales que se indican en el listado en la Tabla 1, que se ha mencionado anteriormente. Las células HPP y células tumorales se co-cultivaron durante 24 horas o 48 horas a una proporción de 50:1, usando 10^4 células tumorales y 5×10^5 células HPP. Para las líneas de células CCRF-CEM, J.RT3-T3.5, K562, KG1, KG-1a, KU812, NC1-H1417, U-937 y WER1-RB-1, el aumento de la producción de IFN- γ en células HPP a las 24 horas de co-cultivos superó al de las células de sangre del cordón umbilical co-cultivadas con estas líneas celulares durante el mismo tiempo. Véase la FIG. 10A. A las 48 horas de co-cultivo, el aumento de la producción de IFN- γ en células HPP superó al de él las células de sangre del cordón umbilical de todas las líneas de células tumorales. Véase la FIG. 10B. De las líneas de células tumorales, las células K562 indujeron el aumento más elevado de la producción de IFN- γ en células HPP tanto a las 24 horas, las 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 disminuyó un 30 % cuando se cocultivaba con HPP en comparación con células KG-1a cultivadas solas. Los experimentos de cocultivo adicionales realizados usando diferentes fracciones enriquecidas de HPP demostraron que la actividad anti-leucémica de HPP se atribuye en gran medida a la concentración elevada de los linfocitos citolíticos naturales inmaduros únicos caracterizada por una expresión elevada de CD56 $^+$, y falta de la expresión de CD16.

6.6. Ejemplo 6: Supresión de la Proliferación de Células Tumorales *In Vivo* con Células de Perfundido de Placenta Humana

6.6.1. Materiales y Métodos

Este Ejemplo demuestra la eficacia del perfundido de placenta humana *in vivo* contra células tumorales usando un modelo de tumor de xenoinjerto de ratón NOD/SCID.

Cultivo de Células KG-1. Las células KG-1 se mantuvieron en medio de Dulbecco me modificado por Iscove suplementado con un 20 % de suero bovino fetal (medio de crecimiento) a 37 °C en aire al 95 %/CO $_2$ al 5 % y una humedad de un 100 %. El medio en el cultivo se cambió cada día y se hizo un pase de las células a la semana. Las células KG-1 crecen como suspensiones. Por lo tanto, para el cambio de medio o para el pase de las células, las suspensiones celulares se recogieron en tubos de centrifugadora y se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 min en un rotor SORVALL® HERAEUS® (n.º de parte 75006434). El sobrenadante se descartó y una cantidad apropiada del sedimento celular se volvió a suspender en el medio de crecimiento para continuar con el cultivo.

Preparación de Células KG-1 para Implante. Para el implante de células en ratones, las células se recogieron mediante centrifugación como se ha descrito anteriormente. Los sedimentos celulares se recogieron y se volvieron a suspender en solución salina tamponada con fosfato. Para determinar el número de células que se iban a implantar a los ratones, se hizo el recuento de una alícuota de la suspensión celular usando un hemocitómetro. El colorante Azul de Tripano se usó para excluir las células no viables en la suspensión.

Preparación de Células HPP para Implante. Para almacenamiento y descongelación de HPP, las muestras se recibieron congeladas en un recipiente de transporte seco en buenas condiciones. Las unidades se almacenaron el recipiente de transporte seco hasta la descongelación el 7 de febrero de 2007. El día de la descongelación, las unidades de HPP se retiraron del congelador criogénico (una en cada momento) y se colocó en bolsas de plástico de cierre con cremallera. Las bolsas a continuación se colocaron en un baño con agua a 37 °C con agitación suave hasta que las células congeladas habían descongelado en su mayor parte (una pequeña parte congelada permanece en la bolsa). Las bolsas a continuación se retiraron del baño de agua, las unidades se retiraron de las bolsas con cierre con cremallera, y las unidades se voltearon suavemente hasta la descongelación completa. A continuación las unidades se colocaron en una campana de flujo laminar y la superficie externa de la bolsa de sangre se esterilizó mediante pulverización con etanol al 70 %. Las bolsas de sangre se abrieron mediante corte usando tijeras estériles, y las células se transfirieron a tubos cónicos de 50 ml estériles (1 tubo para cada unidad de HPP; 2 tubos para cada unidad de UCB) mediante pipeta estéril. A continuación, se añadieron 10 ml de tampón de descongelación (albúmina humana al 2,5 %, dextrano 40 al 5 %) lentamente a cada tubo con mezcla suave (durante un periodo de 2,2 - 2,9 minutos). Cada bolsa de sangre a continuación se aclaró con 10 ml de tampón de descongelación, que a continuación se añadió lentamente al tubo cónico de 50 ml (durante un periodo de 0,7 - 1,3 min).

Después de la descongelación, cada unidad se almacenó el hielo húmedo antes de la centrifugación. Todos los tubos se centrifugaron durante 10 min (440 x g a 10 °C), los sobrenadantes se aspiraron usando pipetas estériles, y los sedimentos se interrumpieron suavemente mediante agitación del tubo. Una alícuota de 1 ml de vehículo (PBS +

suero bovino fetal al 1 %) se añadió a uno de los tubos, y el tubo se mezcló mediante agitación suave. Usando una pipeta de 2 ml, los contenidos se transfirieron a un segundo tubo y a continuación a un tercer tubo y a continuación a un cuarto tubo. Los tubos vacíos se lavaron con 0,2 ml de tampón de dilución.

5 Para el recuento celular, una alícuota de 25 µl se transfirió a un tubo cónico de 15 ml que contenía 975 µl de vehículo en hielo. A continuación los eritrocitos se sometieron a análisis mediante la adición de 4 ml de reactivo de lisis de cloruro de amonio frío e incubando en hielo durante 10 min. Después de la incubación, se añadieron 5 ml de PBS cedió a cada tubo y los tubos se centrifugaron (10 min, 400 x g, 10 °C). Después de lisis de RBC, se hizo el recuento de las células con un hemo citómetro, usando azul de tripano para evaluar la viabilidad. Los resultados del recuento se corrigieron para dilución y a continuación se dividieron entre un factor de lisis (0,46) para calcular el número de células presentes antes de la lisis de RBC.

10 Para la preparación de la dosis de HPP, después del recuento, las células HPP se diluyeron hasta 1×10^8 células/ml mediante la adición de vehículo. Las células HPP a continuación se almacenaron en hielo hasta que las jeringas se cargaron. El tiempo transcurrido entre la descongelación de la primera unidad y la finalización de la preparación de la dosis fue inferior a 3 horas.

15 Antes de llenar las jeringas, una alícuota de 50 µl del material de dosificación se reservó para verificación después de la dosis mediante recuento como se ha descrito anteriormente. Después de la dosificación, en materia de dosis restante se evaluó para la verificación de la dosis.

20 *Diseño del Estudio.* El Día 1, veinticuatro ratones NOD/SCID macho (Jackson Laboratories) se implantaron con 5 millones de células KG-1 viables S/C en la región del costado. Los ratones separan de modo que de cuatro a cinco ratones se alojaron en un sistema de jaula de micro-aislamiento con lecho de trocitos de madera. A los roedores esterilizados se les proporcionó alimento y agua a voluntad. Los ratones se monitorizaron de cerca dos veces a la semana para crecimiento tumoral. El primer tumor mensurable se observó el Día 25. Los pesos corporales se registraron a continuación una vez a la semana y las mediciones del tumor se registraron dos veces a la semana con un calibrador. El Día 52 después del implante, los animales se clasificaron de forma aleatoria entre los grupos separados, con volúmenes morales con un promedio de aproximadamente 300-350 mm³. Véase la Tabla 13, que sigue a continuación. El primer grupo consistió en cuatro ratones de control con un volumen tumoral medio 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 tumoral medio de 345 mm³ consistió en cuatro ratones implantados por vía intravenosa con 200 µl de células HPP por ratón (2×10^7 células). El último grupo, implantado por IT con 50 µl de células HPP por ratón también consistió en cuatro ratones con un volumen tumoral medio de 332 mm³.

Tabla 13: Grupos experimentales para experimentos de supresión tumoral *in vivo*.

Animal N.º	Grupo de Tratamiento con HPP	Volumen Tumoral el Día del Implante de HPP
Grupo 1 (Control)		
1	IV 1	457
2	IT 2	429
3	IT 3	214
4	IV 4	147
	Media:	312
Grupo 2 (Implante Celular IV)		
5	1	466
6	2	209
7	3	217
8	4	487
	Media:	345
Grupo 3 (Implante Celular IT)		
9	1	491
10	2	256
11	3	296
12	4	285
	Media:	332

IV - 200 µl de implante; IT - 50 µl de implante.

El Día 66, 14 días después del implante de células HPP, el estudio terminó debido a los volúmenes tumorales elevados.

6.6.2. Resultados

5 Los volúmenes tumorales (TV) se midieron hasta el Día 66 (día 14 después del implante de células HPP) cuando el TV de los grupos de control alcanzó un promedio de 2921 mm³. El grupo de tratamiento IV al final del estudio tenía un TV medio de 2076 mm³, y el grupo de IT tenía un TV de 2705 mm³. Con respecto al % de aumento en el tratamiento posterior del TV, el grupo de IT mostró una inhibición de un 20 % modesta mientras que el grupo IV mostró una inhibición de más de un 35 % del crecimiento tumoral en comparación con el grupo de control. La inhibición en el grupo IT era demostrable. Véase la FIG. 11.

6.7. Ejemplo 7: Supresión de la Proliferación de Células Tumorales *In Vivo* con Linfocitos NK de Placenta Cultivados

6.7.1. Materiales y Métodos

Este Ejemplo demuestra la eficacia de los linfocitos NK (PINK) de placenta cultivados durante 21 días *in vivo* contra células tumorales usando un modelo de tumor de xenoinjerto de ratón NOD/SCID.

15 *Cultivo de Células KG-1.* Las células KG-1 (una línea de células mieloides humanas) se mantuvieron en medio de Dulbecco me modificado por Iscove suplementado con un 20 % de suero bovino fetal (medio de crecimiento) a 37 °C en aire al 95 %/CO₂ al 5 % y una humedad de un 100 %. El medio en el cultivo se cambió cada día y se hizo un pase de las células a la semana. Las células KG-1 crecen como suspensiones. Por lo tanto, para el cambio de medio o para el pase de las células, las suspensiones celulares se recogieron en tubos de centrifugadora y se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 min en un rotor SORVALL® HERAEUS® (n.º de parte 75006434). El sobrenadante se descartó y una cantidad apropiada del sedimento celular se volvió a suspender en el medio de crecimiento para continuar con el cultivo.

25 *Preparación de Células KG-1 para Implante.* Para el implante de células en ratones, las células se recogieron mediante centrifugación como se ha descrito anteriormente. Los sedimentos celulares se recogieron y se volvieron a suspender en solución salina tamponada con fosfato. Para determinar el número de células que se iban a implantar a los ratones, se hizo el recuento de una alícuota de la suspensión celular usando un hemocitómetro. El colorante Azul de Tripano se usó para determinar la viabilidad.

30 *Preparación de Linfocitos NK para Implante.* El día de la descongelación, los linfocitos NK crioconservados en crio-viales se retiraron del congelador criogénico y se colocaron inmediatamente en una bolsa de cierre con cremallera. La bolsa de cierre con cremallera que contenía los crio-viales a continuación se sumergió en un baño con agua a 37 °C establecido previamente con agitación hasta que las células congeladas habían descongelado en su mayor parte. A continuación la bolsa con cierre de cremallera se retiró del baño de agua, se limpió con etanol al 70 %, y se transfirió a una campana de flujo laminar. Los linfocitos NK se transfirieron desde los crio-viales a un tubo cónico de 50 ml con pipeta. A continuación, 10 volúmenes de Tampón de Dilución (Plasmalyte A + HSA al 2,5 %) se añadió a los linfocitos NK. Los tubos centrifugaron a 1500 rpm (475g) durante 8 minutos y el sobrenadante se retiró. A continuación los elementos celulares se volvieron a suspender en Tampón de Dilución (Plasmalyte A + HSA al 2,5 %) (En general, el volumen de Tampón de Dilución = 1 ml x el número de viales descongelados; Por ejemplo, si las células se combinan desde 4 viales, entonces añadir 4 ml de campo de dilución). El recuento celular se realizó usando un hemocitómetro y para evaluar la viabilidad celular se usó azul de tripano.

40 Después del recuento, los linfocitos NK se diluyeron hasta las concentraciones deseadas (Tabla 14) con Tampón de Dilución. Los linfocitos NK a continuación se almacenaron en hielo hasta que las jeringas se cargaron. El tiempo transcurrido entre la descongelación de la primera unidad y la finalización de la preparación de la dosis fue inferior a 3 horas. Antes de cargar las jeringas, una alícuota de 50 ml de material de dosificación se reservó para la verificación después de la dosis mediante recuento como se ha descrito anteriormente. Después de la dosificación, el material de dosis restante se evaluó para verificación de la dosis.

45 *Diseño del Estudio.* El Día 1, 70 ratones NOD/SCID macho (Jackson Laboratories) se implantaron con 5 millones de células KG-1 viables por vía subcutánea en la región del costado. Los ratones separan de modo que de cuatro a cinco ratones se alojaron en un sistema de jaula de micro-aislamiento con lecho de trocitos de madera. A los roedores esterilizados se les proporcionó alimento y agua a voluntad. Los ratones se monitorizaron de cerca dos veces a la semana para crecimiento tumoral. Después de observar un primer tumor mensurable, los pesos corporales se registraron a continuación una vez a la semana y las mediciones tumorales se registraron dos veces a la semana con un calibrador. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron 80-100 mm³, los ratones se clasificaron de forma aleatoria en 8 grupos usando solo los ratones que tenían los volúmenes tumorales más cercanos al valor medio. Los ratones con volúmenes tumorales demasiado grandes o demasiado pequeños se excluyeron del estudio. El tratamiento con linfocitos NK se inició el día después de la clasificación al azar de forma aleatoria. Las vías de dosificación fueron inyecciones intravenosas (i.v.) o intra-tumoral (IT) como se describe en la Tabla 1. El estudio término 21 días después de la administración de los linfocitos NK.

ES 2 713 524 T3

Grupo	N.º de Ratones	Tratamiento	Dosis y Vía de Dosificación	Volumen de Dosificación
1	8	Control	Vehículo	
2	6	Linfocitos NK sin expandir	2,0 x 10 ⁶	0,3 ml
3	8	linfocito NK (Donante 1)	2,0 x 10 ⁶ (i.v.)	0,3 ml
4	8	Linfocitos NK (Donante 1)	6,0 x 10 ⁶ (i.v.)	0,3 ml
5	8	Linfocitos NK (Donante 1)	2,0 x 10 ⁶ (IT)	0,05 ml
6	8	Linfocitos NK (Donante 2)	2,0 x 10 ⁶ (i.v.)	0,3 ml
7	8	Linfocitos NK (Donante 2)	6,0 x 10 ⁶ (i.v.)	0,3 ml
8	8	Linfocitos NK (Donante 2)	2,0 x 10 ⁶ (IT)	0,05 ml

Tabla 14: Diseño del Estudio

Resultados: Los volúmenes tumorales (TV) se midieron dos veces a la semana hasta el día 21 después de la administración de linfocitos NK (Tabla 15). Usando linfocitos NK obtenidos a partir del donante 1, el grupo de dosis IV elevada mostró una supresión tumoral significativa el día 6 después de la administración de linfocitos NK. El grupo de dosis IV elevada y el grupo de IT mostró una supresión tumoral significativa el día 13 y el día 21 después de la administración de linfocitos NK. Usando linfocitos NK obtenidos a partir del donante 2, el grupo de dosis IV elevada y el grupo de IT mostró una supresión tumoral significativa comenzando el día 6 y el día 13 después de la administración de linfocitos NK. Los tres grupos de tratamiento mostraron una supresión tumoral significativa el día 21 después de la administración de linfocitos NK.

Tabla 15: Compendio de supresión tumoral *in vivo* por linfocitos NK de placenta cultivados durante 21 días.

Media: media de 8 animales; DT: desviación típica para medias de población de 8 animales; ET: error típico para medias de población de 8 animales; valor p: el ensayo t de dos muestras usa to para determinar si las medias de población son iguales en grupos tratados con Vehículo y tratados con NK en diversos puntos temporales.

	VT (mm3)	Día 1	Día 4	Día 6	Día 9	Día 13	Día 15	Día 18	Día 21
Vehículo	Media	93,28	233,94	279,24	357,13	575,57	687,20	862,02	1345,66
	DT	20,11	52,37	38,98	71,61	88,42	91,07	142,31	279,82
	ET	7,60	19,79	14,73	27,07	33,42	34,42	53,79	105,76
NK1-IV-2MM	Media	93,14	237,90	264,53	336,65	541,97	642,34	950,84	1170,16
	DT	20,02	57,17	57,55	84,97	147,18	193,69	327,02	243,09
	ET	7,57	21,61	21,75	32,11	55,63	73,21	123,60	91,88
	Valor p	0,49	0,44	0,28	0,31	0,29	0,28	0,25	0,10
NK1-IV-6MM	Media	93,84	198,14	240,82	267,50	449,88	553,22	769,39	1030,13
	DT	19,25	50,53	45,90	55,34	128,50	144,91	185,08	263,54
	ET	7,27	19,10	17,35	20,92	48,57	54,77	69,96	99,61
	Valor p	0,48	0,09	0,05	0,01	0,02	0,02	0,14	0,02
NK1-IT-2MM	Media	93,87	215,93	266,55	328,94	450,18	574,89	730,97	832,68
	DT	19,20	74,10	58,06	72,69	127,35	155,68	202,13	326,93
	ET	7,26	28,01	21,94	27,48	48,13	58,84	76,40	123,57
	Valor p	0,48	0,29	0,31	0,22	0,02	0,05	0,08	0,00
NK2-IV-2MM	Media	94,77	192,91	268,05	335,38	529,99	634,11	846,61	1113,85
	DT	18,57	34,56	55,02	37,38	116,48	147,00	165,72	204,24
	ET	7,58	14,11	22,46	15,26	47,55	60,01	67,65	83,38
	Valor p	0,44	0,05	0,33	0,24	0,20	0,20	0,42	0,05
NK2-IV-6MM	Media	93,06	193,64	241,05	304,40	472,32	596,11	834,62	1091,41
	DT	15,97	34,04	40,09	49,47	96,65	137,62	201,18	313,09
	ET	6,04	12,87	15,15	18,70	36,53	52,02	76,04	118,34
	Valor p	0,49	0,04	0,04	0,05	0,02	0,07	0,38	0,05
NK2-IT-2MM	Media	92,65	164,47	207,40	256,88	347,15	505,84	764,87	1029,05

	VT (mm3)	Día 1	Día 4	Día 6	Día 9	Día 13	Día 15	Día 18	Día 21
	DT	14,64	54,75	55,67	69,20	100,70	144,71	259,06	387,86
	ET	5,53	20,69	21,04	26,15	38,06	54,70	97,92	146,60
	Valor p	0,47	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,18	0,04

VT = volumen tumoral

6.8. Ejemplo 8: Supresión de Proliferación de Células CML *In Vivo* con Linfocitos NK de Placenta Cultivados

5 El ejemplo demuestra la eficacia de los linfocitos NK de placenta cultivados durante 21 días en el crecimiento de xenoinjertos de leucemia humana K562 en ratones NOD/SCID.

10 *Cultivo Celular.* Las células K562, una línea de células de leucemia mielógena crónica, se mantuvieron en medio de Dulbecco me modificado por Iscove (IMDM) suplementado con un 20 % de suero bovino fetal. Las células se cultivaron a 37 °C en aire al 95 %/CO₂ al 5 % y una humedad de un 100 %. El medio en el cultivo se cambió cada día y se hizo un pase de las células a la semana. Esta línea celular creció como suspensiones. Por lo tanto, para el cambio de medio o para el pase de las células, las suspensiones celulares se recogieron en tubos de centrifugadora y se centrifugó a 2.000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se descartó y una cantidad apropiada de los sedimentos celulares se volvió a suspender en el medio apropiado para continuar con el cultivo.

15 *Preparación de células K562 para implante.* Para implante en ratones, las células se cosecharon mediante centrifugación como se ha descrito anteriormente. Los sedimentos celulares se recogieron y se volvieron a suspender en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Para determinar el número de células que se iban a implantar a los ratones, se hizo el recuento de una alícuota de la suspensión celular usando un hemocitómetro, y el colorante Azul de Tripano se usó para medir el número de células viables en la suspensión. Las células recogidas se lavaron una vez con PBS y se volvieron a suspender en medio sin suero a una densidad de 5 x 10⁶ células/100 µl.

20 *Preparación de los Linfocitos NK para administración de la dosificación.* Se usaron dos líneas de linfocitos NK, cuyas características se describen en la Tabla 16.

Tabla 16: Descripción de linfocitos NK

N.º de ID de Linfocitos NK	Viabilidad	% de CD56 ⁺ CD3 ⁻	% de CD56 ⁺ CD3 ⁺	Citotoxicidad <i>In Vitro</i> Contra K562
1	82 %	89,3	4,7	70 %
2	85 %	38,6	39,6	46 %

El día de la descongelación, los linfocitos NK crioconservados se descongelan y se hizo su recuento. Después del recuento, los linfocitos NK se diluyeron a las concentraciones deseadas (Tabla 17):

25 Tabla 17: Diseño del estudio del estudio de xenoinjerto de K562; células administradas por vía intravenosa (i.v.) o por vía intratumoral (IT)

Grupo	N.º de Ratones	Tratamiento	Nivel de Dosis y Vía de Dosificación	Volumen de Dosificación
1	16	Plasmalyte A	i.v.	0,3 ml
2	8	N.º de ID de Linfocitos NK 1	6,0 x 10 ⁶ (i.v.)	0,3 ml
3	8	N.º de ID de Linfocitos NK 1	2,0 x 10 ⁶ (IT)	0,05 ml
4	16	N.º de ID de Linfocitos NK 2	2,0 x 10 ⁶ (i.v.)	0,3 ml
5	8	N.º de ID de Linfocitos NK 2	6,0 x 10 ⁶ (i.v.)	0,3 ml
6	8	N.º de ID de Linfocitos NK	2,0 x 10 ⁶ (IT)	0,05 ml

A continuación los linfocitos NK se almacenaron en hielo hasta que se cargaron en jeringas.

30 *Procedimiento del ensayo.* Para iniciar el estudio, 5 x 10⁶ células viables K562, suspendidas en 100 µl de medio sin suero, se implantaron por vía subcutánea a los ratones atímicos en la región del costado derecho. Cien ratones se implantaron con células K562. Los animales se monitorizaron para crecimiento tumoral a diario después del

implante celular. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron 80-100 mm³, los ratones se clasificaron de forma aleatoria en 8 grupos usando solo los ratones que tenían los volúmenes tumorales más cercanos al valor medio. Los ratones con volúmenes tumorales demasiado grandes o demasiado pequeños se excluyeron del estudio. El tratamiento con los linfocitos NK se inició el día después de la clasificación de forma aleatoria, y solo se administró una sola dosis de linfocitos NK a los ratones. Los volúmenes tumorales se midieron usando la fórmula $V = L \times W \times H \times \pi/6$, donde L y W representan los diámetros más largo y más corto del tumor y H representaba la altura del tumor. Durante todo el estudio, los volúmenes tumorales se midieron dos veces a la semana y los pesos corporales una vez a la semana. Los animales se observaron para posible efecto tóxico por el tratamiento con linfocitos NK. Se realizaron sacrificios sin programa cuando los volúmenes tumorales superaban 1.500 mm³, o la pérdida de los pesos corporales originales superaba un 20 %, o se producía ulceración tumoral, o los ratones llegaban a estar moribundos. Al final del experimento, el análisis estadístico se realizó en la tasa de crecimiento tumoral entre el grupo de control y cada grupo de tratamiento. Los tejidos de los órganos principales se recogieron al finalizar el estudio.

Resultados. Las tasas de crecimiento de tumores de leucemia K562 se redujeron de forma clara con los Linfocitos NK ID No. 1 a un nivel de dosis intravenosa de 6 millones, o a un nivel de dosis intratumoral de 2 millones se inhibía el crecimiento de los tumores K562. El efecto inhibitorio del crecimiento era estadísticamente significativo en la dosis por vía intratumoral ($P < 0,05$ con el ensayo t de Student). Los tumores en los 3 grupos tratados con 091008 linfocitos NK no se redujeron de forma significativa.

Durante el transcurso del estudio, 3 de los 10 tumores regresaron completamente a cero después de 13 días de tratamiento. Además, durante todo el estudio, todos los animales permanecieron sanos y activos, y ninguno de los ratones en cada grupo perdió peso corporal, lo que indica que la administración de linfocitos NK, por sí misma, no daba como resultado un aumento de la morbilidad y en general era segura.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Celgene Cellular Therapeutics Zhang, Xiaokui Kang, Lin Heidarán, Mohammad Jasko, Steven Zeitlin, Andy Pal, Ajai Hariri, Robert B.
- 5 <120> SUPRESIÓN TUMORAL USANDO LINFOCITOS CITOLÍTICOS NATURALES INTERMEDIOS OBTENIDOS A PARTIR DE PLACENTA HUMANA Y COMPUESTOS INMUNOMODULADORES
- <130> 9516-834-999
- 10 <150> US 61/163,449
<151> 26-03-2009
- <160> 20
- 15 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
<211> 22
<212> ARN
- 20 <213> Homo sapiens
- <400> 1
aaccgguaga uccgaacuug ug 22
- 25 <210> 2
<211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens
- 30 <400> 2
ucggauccgu cugagcuugg cu 22
- <210> 3
<211> 22
<212> ARN
- 35 <213> Homo sapiens
- <400> 3
uuccuuugu cauccuucgc cu 22
- 40 <210> 4
<211> 23
<212> ARN
<213> Homo sapiens
- 45 <400> 4
uaagugcuuc cauguuucag ugg 23
- <210> 5
<211> 20
<212> ARN
- 50 <213> Homo sapiens
- <400> 5
ccucugggcc cuuccaccag 20
- <210> 6
<211> 23
<212> ARN
- 60 <213> Homo sapiens
- <400> 6
uccaguccu auaugaugcc uuu 23

ES 2 713 524 T3

<210> 7
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 7
 cagcagcaca cugugguug u 21
 <210> 8
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 10
 <400> 8
 aagugcuguc auagcugagg uc 22
 <210> 9
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 9
 uucuccaaaa gaaagcacuu ucug 24
 <210> 10
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 25
 <400> 10
 ucgugcaucc cuuuagagug uu 22
 <210> 11
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 11
 aucgugcauc cuuuuagagu gu 22
 <210> 12
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 40
 <400> 12
 aaagcgcuuc ccuugcugg a 21
 <210> 13
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 13
 aaagcgcuuc ccuucagagu g 21
 <210> 14
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 60
 <400> 14
 caaagugccu cccuuuagag ug 22
 <210> 15
 <211> 24

ES 2 713 524 T3

<212> ARN
 <213> Homo sapiens

 <400> 15
 5 acaaagugcu uccuuuaga gugu 24

 <210> 16
 <211> 22
 <212> ARN
 10 <213> Homo sapiens

 <400> 16
 acaaagugcu uccuuuaga gu 22

 15 <210> 17
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 20 <400> 17
 aggcacggug ucagcaggc 19

 <210> 18
 <211> 19
 25 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 <400> 18
 30 gggcgccugu gauccaac 19

 <210> 19
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 19
 aaacucuacu uguccuucug agu 23

 <210> 20
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 <400> 20
 45 aaccguaga uccgaucuug ug 22

REIVINDICACIONES

1. Linfocitos citolíticos naturales aislados que comprenden linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻ aislados para uso en un método para tratamiento de un individuo que tiene cáncer, en donde el método comprende la administración, a dicho individuo, de dichos linfocitos citolíticos naturales aislados que comprenden linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻ aislados,
- 5 en donde dichos linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta se aíslan a partir de perfundido de placenta y expresan uno o más de los microARN 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 elevado que los linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica;
- 10 y
- en donde dicho cáncer es leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda de precursores B, leucemia linfoblástica aguda de precursores T, leucemia de Burkitt (linfoma de Burkitt), leucemia bifenotípica aguda, leucemia monocítica crónica, leucemia linfocítica crónica (CLL)/linfoma linfocítica de células pequeñas, leucemia prolinfocítica de linfocitos B; linfoma de células pilosas; leucemia prolinfocítica de linfocitos T, linfoma linfoplasmocítico, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma esplénico de la zona marginal, plasmocitoma, una enfermedad por deposición de inmunoglobulina monoclonal, o una enfermedad de cadena pesada, linfoma de linfocitos B extranodal de la zona marginal (linfoma MALT), linfoma de linfocitos B nodal de la zona marginal (NMZL), linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de linfocitos B grandes y difusos, linfoma mediastínico (tímico) de linfocitos B grandes, linfoma intravascular de linfocitos B grandes, linfoma por efusión primaria, leucemia linfocítica granular de linfocitos T grandes, leucemia de linfocitos NK agresiva, linfoma de linfocitos NK/T extranodal, linfoma de linfocitos T de tipo nasal, de tipo enteropatía, linfoma de linfocitos T hepatoesplénicos, linfoma de linfocitos NK blásticos, micosis fungoide (síndrome de Sezary), un trastorno linfoproliferativo de linfocitos T CD30 positivos cutáneo primario, linfoma macrocítico anaplásico cutáneo primario, papulosis linfomatoide, linfoma de linfocitos T angioinmunoblástico, linfoma periférico de linfocitos T, linfoma macrocítico anaplásico, no especificado, un linfoma de Hodgkin, o un linfoma de Hodgkin con predominio de linfocitos nodulares.
- 15
2. Los linfocitos citolíticos naturales aislados para uso según la reivindicación 1, en donde el método comprende adicionalmente la administración, a dicho individuo, de una cantidad eficaz de lenalidomida, pomalidomida, o talidomida.
- 20
3. Los linfocitos citolíticos naturales aislados para uso según la reivindicación 1, en donde dichos linfocitos citolíticos naturales aislados se han puesto en contacto con pomalidomida, lenalidomida, o talidomida antes de dicha administración.
- 25
4. Los linfocitos citolíticos naturales aislados para uso según la reivindicación 1, en donde dichos linfocitos citolíticos naturales comprenden linfocitos citolíticos naturales no obtenidos a partir de perfundido de placenta.
- 30
5. Linfocitos citolíticos naturales aislados que comprenden linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻ aislados para uso en un método para tratamiento de un individuo que tiene una infección vírica, en donde el método comprende la administración, a dicho individuo, de dichos linfocitos citolíticos naturales aislados que comprenden linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻ aislados,
- 35 en donde dichos linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta se aíslan a partir de perfundido de placenta y expresan uno o más de los microARN 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 elevado que los linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica.
- 40
6. Los linfocitos citolíticos naturales aislados para uso según la reivindicación 5, en donde el método comprende adicionalmente la administración, a dicho individuo, de una cantidad eficaz de lenalidomida, pomalidomida, o talidomida.
- 45
7. Los linfocitos citolíticos naturales aislados para uso según la reivindicación 5, en donde dichos linfocitos citolíticos naturales aislados se han puesto en contacto con pomalidomida, lenalidomida, o talidomida antes de dicha administración.
- 50
8. Los linfocitos citolíticos naturales aislados para uso según la reivindicación 5, en donde dichos linfocitos citolíticos naturales comprenden linfocitos citolíticos naturales no obtenidos a partir de perfundido de placenta.
- 55
9. Los linfocitos citolíticos naturales aislados para uso según la reivindicación 1 o 5, en donde dichos linfocitos citolíticos naturales son linfocitos citolíticos naturales combinados que comprenden linfocitos citolíticos naturales

aislados de perfundido de placenta y linfocitos citolíticos naturales aislados de sangre del cordón umbilical.

10. Los linfocitos citolíticos naturales aislados para uso según la reivindicación 9, en donde dicha sangre del cordón umbilical se aísla de la placenta a partir de la que se obtiene dicho perfundido de placenta.
- 5 11. Los linfocitos citolíticos naturales aislados para uso según la reivindicación 9, en donde dichos linfocitos citolíticos naturales combinados comprenden:
- un número de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺CD16⁻ detectablemente más elevado que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica;
- un número de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺CD16⁻ detectablemente menor que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica;
- 10 un número de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺KIR2DL2/L3⁺ detectablemente más elevado que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica;
- un número de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺NKp46⁺ detectablemente menor que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica;
- 15 un número de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺NKp30⁺ detectablemente más elevado que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica;
- un número de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺2B4⁺ detectablemente más elevado que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica; o
- un número de linfocitos citolíticos naturales CD3⁺CD56⁺CD94⁺ detectablemente más elevado que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica.
- 20 12. Los linfocitos citolíticos naturales aislados para uso según la reivindicación 3 o 7, en donde dichos linfocitos citolíticos naturales se ponen en contacto con dicha pomalidomida, lenalidomida, o talidomida en una cantidad y durante un periodo de tiempo suficiente para que dichos linfocitos citolíticos naturales expresen de forma detectable más granzima B, o ARNm que codifica granzima B, que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales que no se ponen en contacto con dicha pomalidomida, lenalidomida, o talidomida.
- 25 13. Los linfocitos citolíticos naturales aislados para uso según la reivindicación 1 o 5, en donde dichos linfocitos citolíticos naturales no se han cultivado antes de dicha administración.
14. Los linfocitos citolíticos naturales aislados para uso según la reivindicación 1 o 5, en donde dichos linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta expresan una o más de proteína aminopeptidasa N, proteína apolipoproteína E, proteína 1 de interacción con atrofina-1, proteína inxina inx-3, proteína precursora de integrina alfa-2, proteína precursora de integrina beta-5, proteína precursora de glicoproteína GP49B de superficie de mastocitos, o proteína del receptor 1 de rianodina; y en donde dichos linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta no expresan una o más de proteína precursora del receptor 4 del factor de crecimiento de fibroblastos, proteína similar al nucleótido 4 asociado a la inmunidad, proteína precursora de integrina alfa-L, proteína precursora de integrina de beta 2, proteína precursora de integrina de beta 4, proteína precursora de mureína transglicosilasa D
- 30 lítica unida a membrana, proteína 8 relacionada con proteína de unión a oxisterol, o proteína del precursor 1 de perforina 1.
- 35

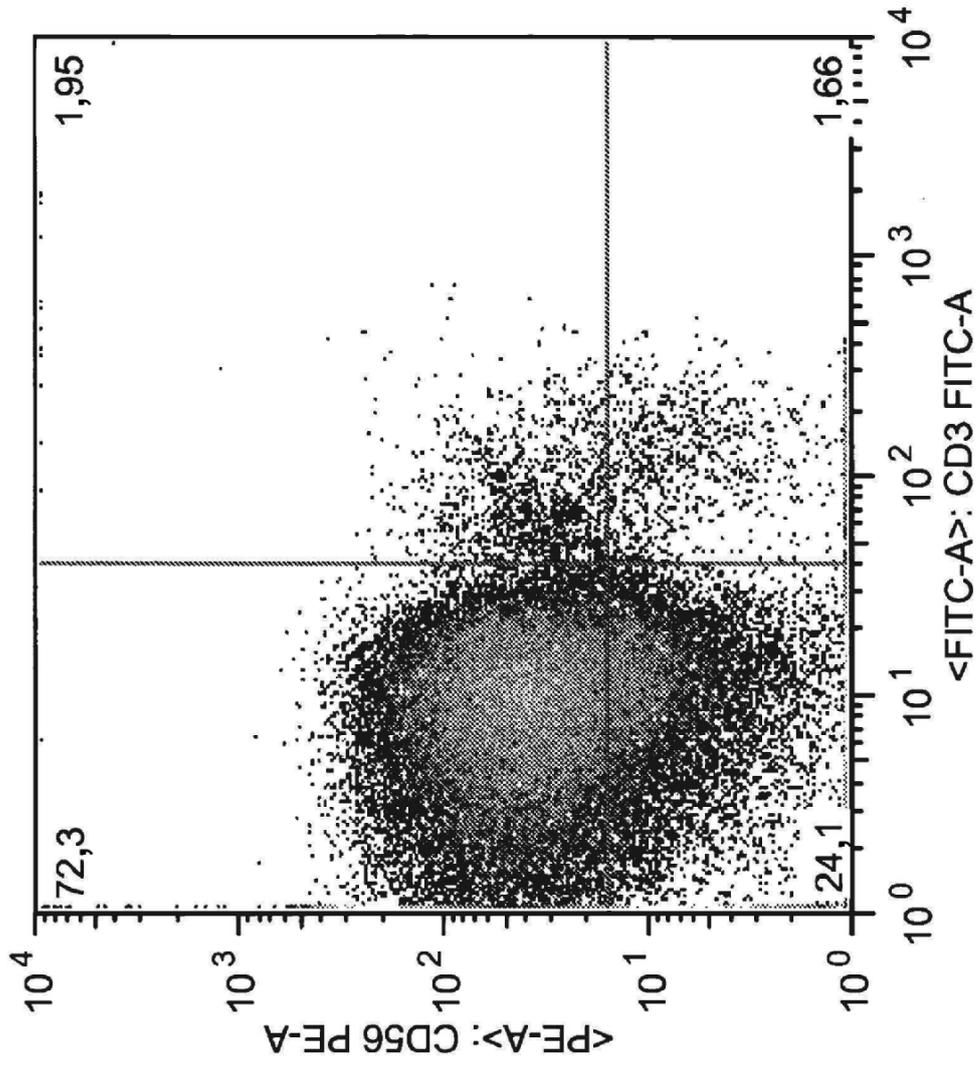


FIG. 1

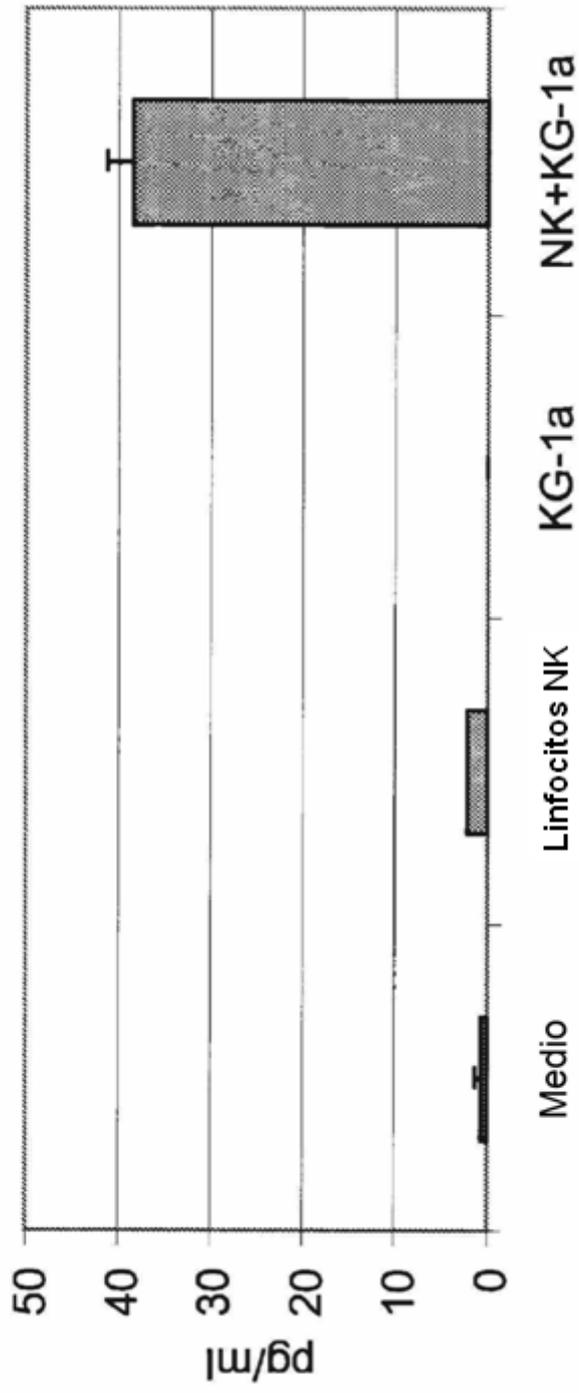


FIG. 2A

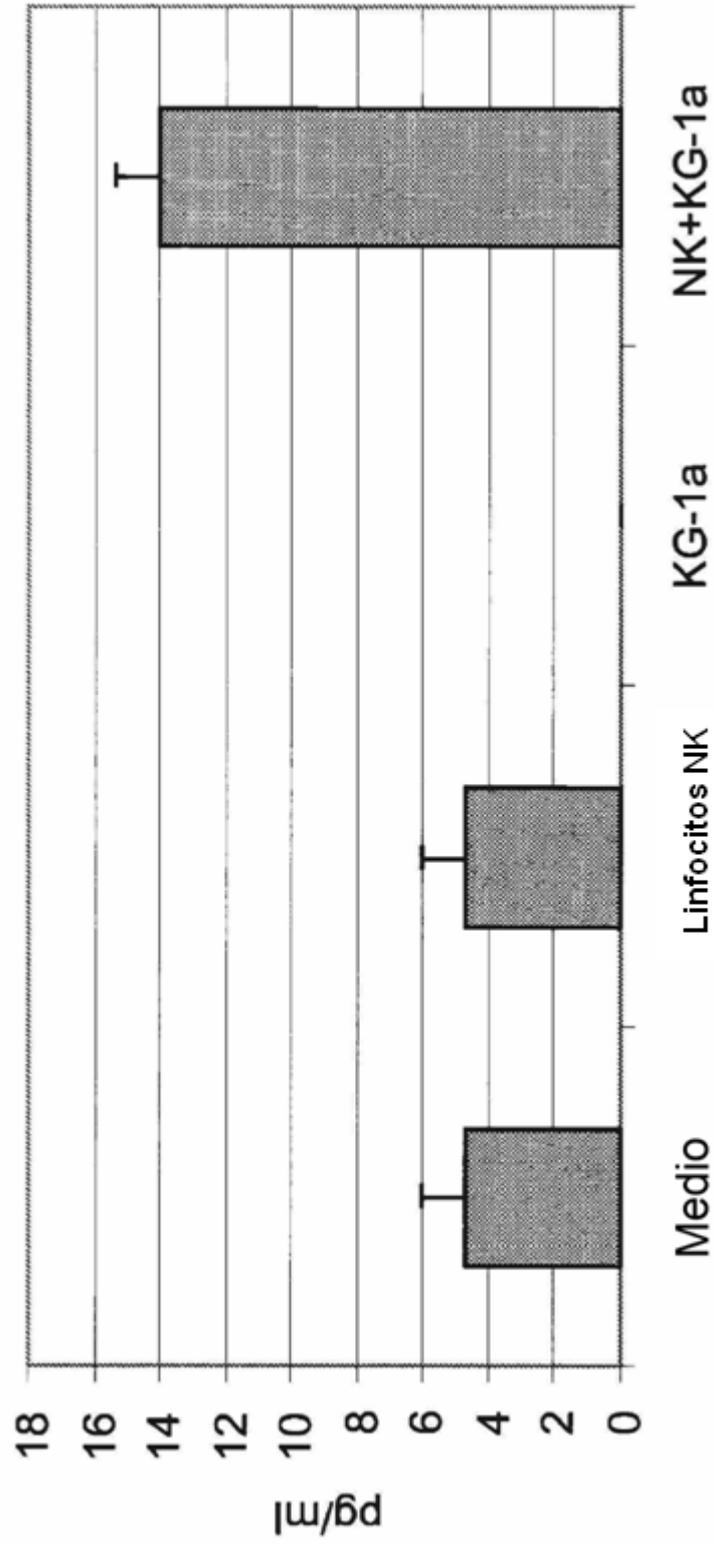


FIG. 2B

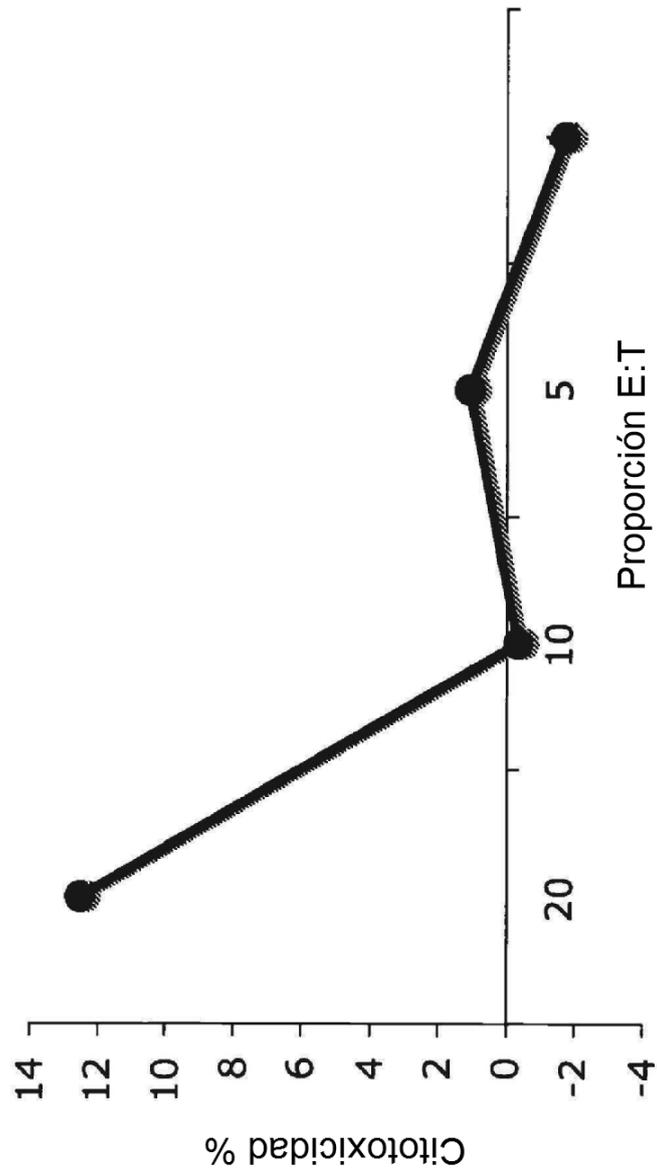


FIG. 3

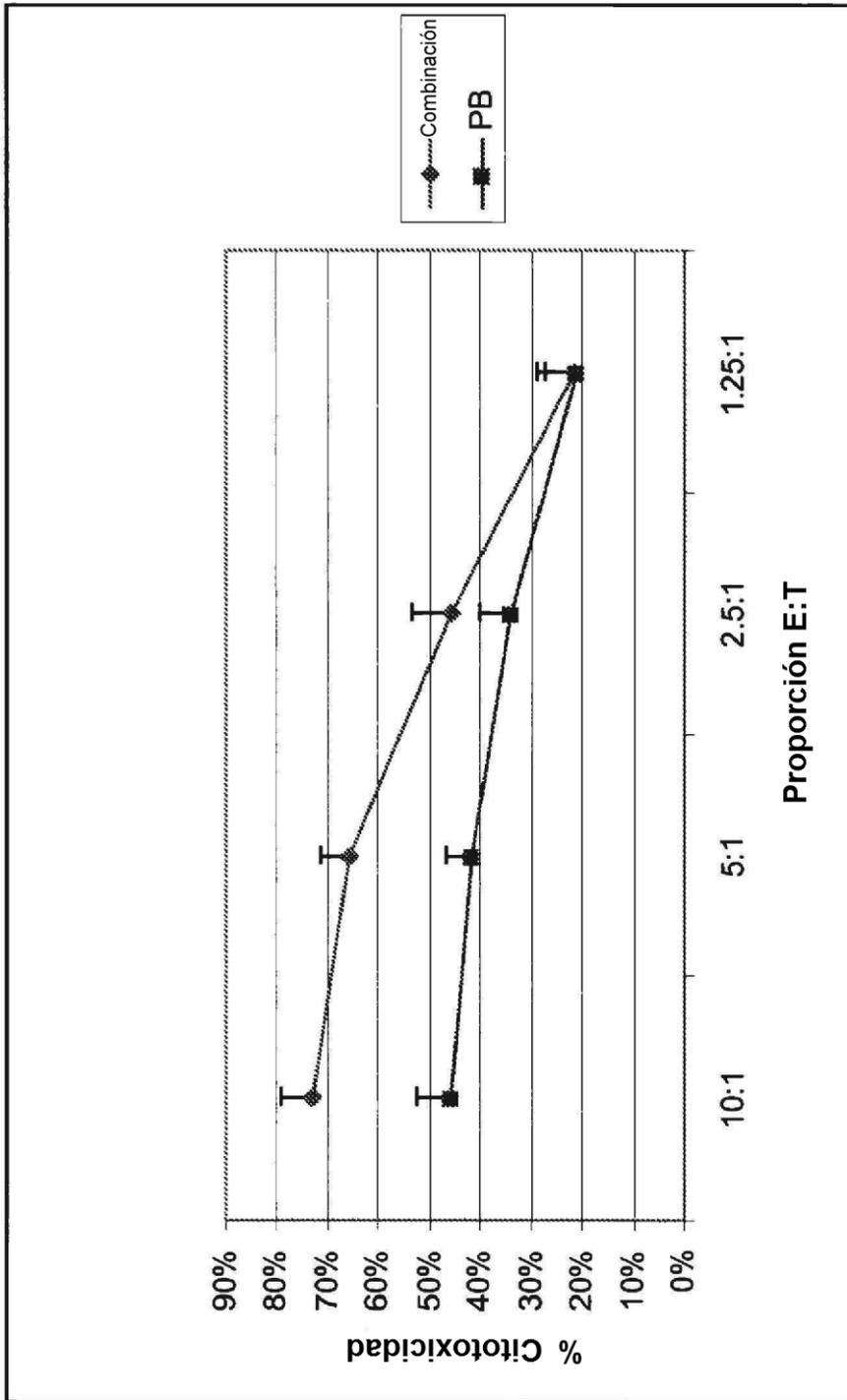


FIG. 4

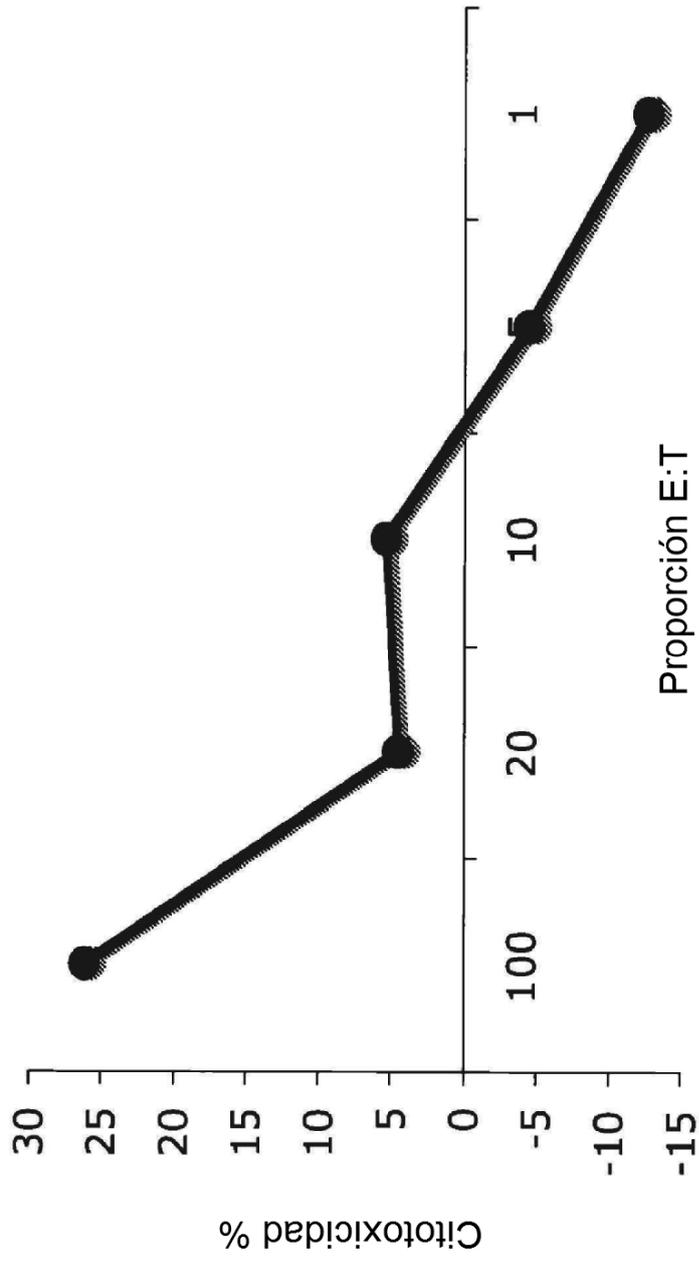
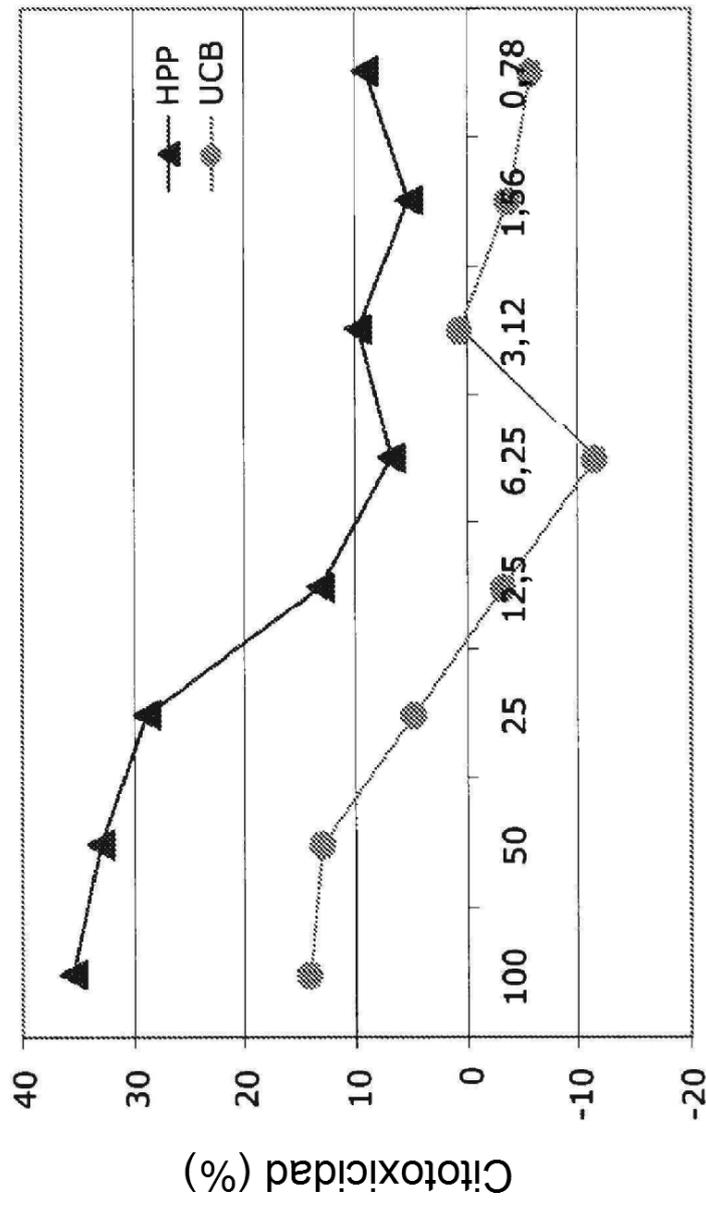


FIG. 5



Efectora : Diana

FIG. 6

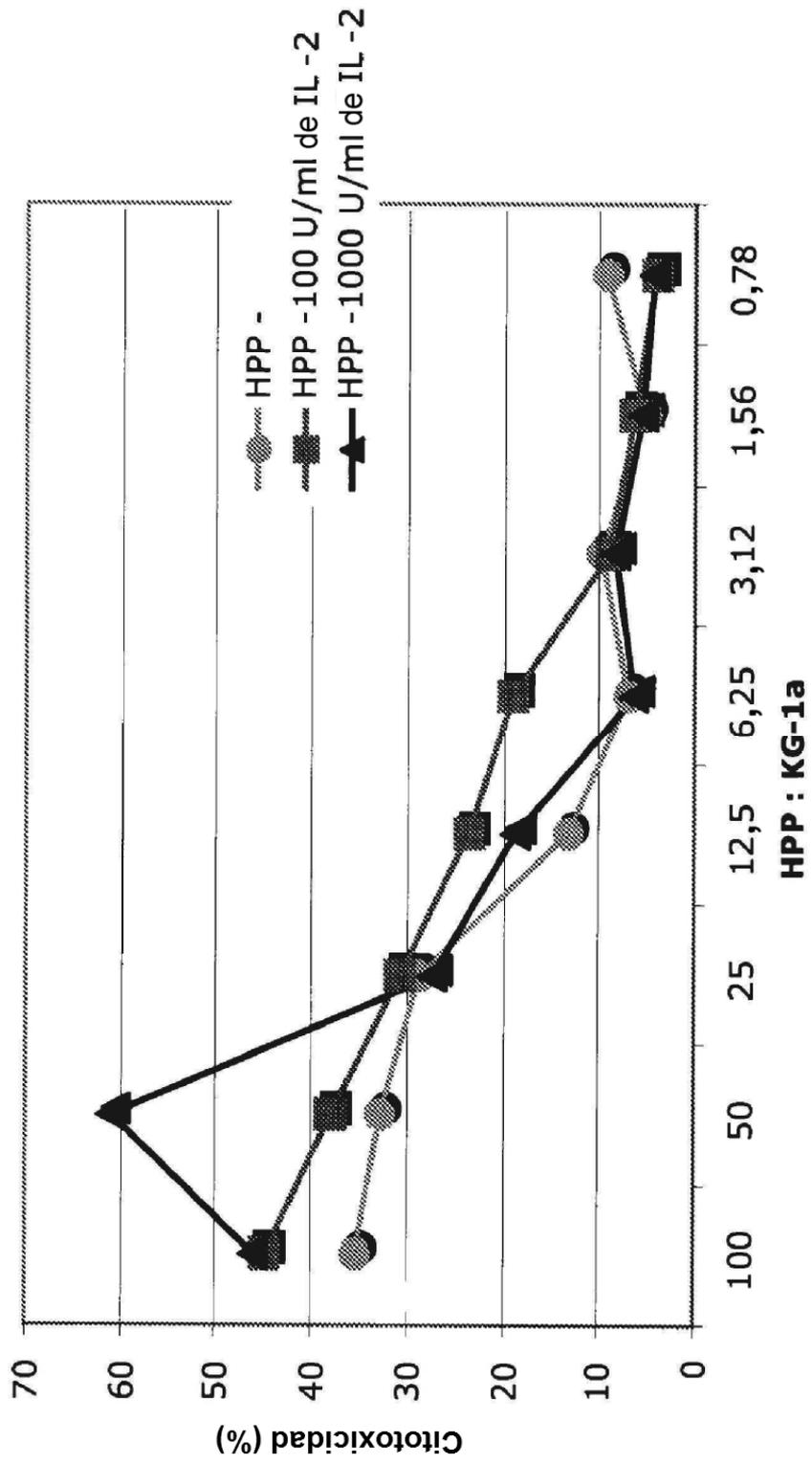
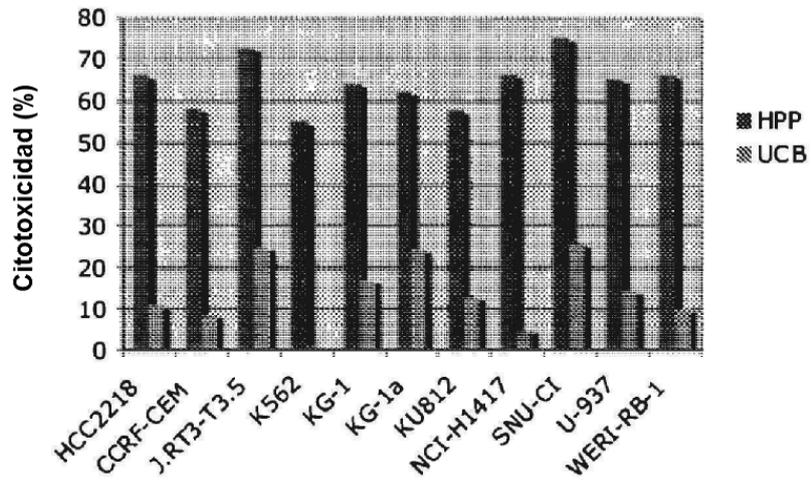
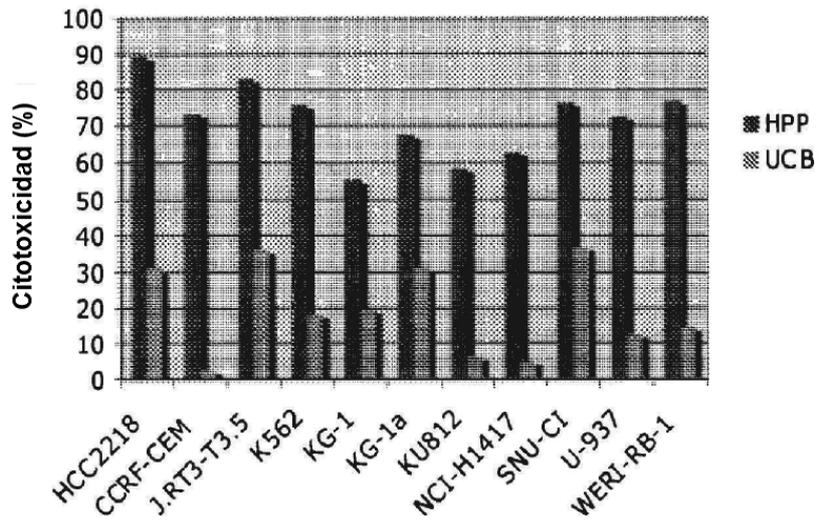


FIG. 7

A



B



FIGS. 8A, 8B

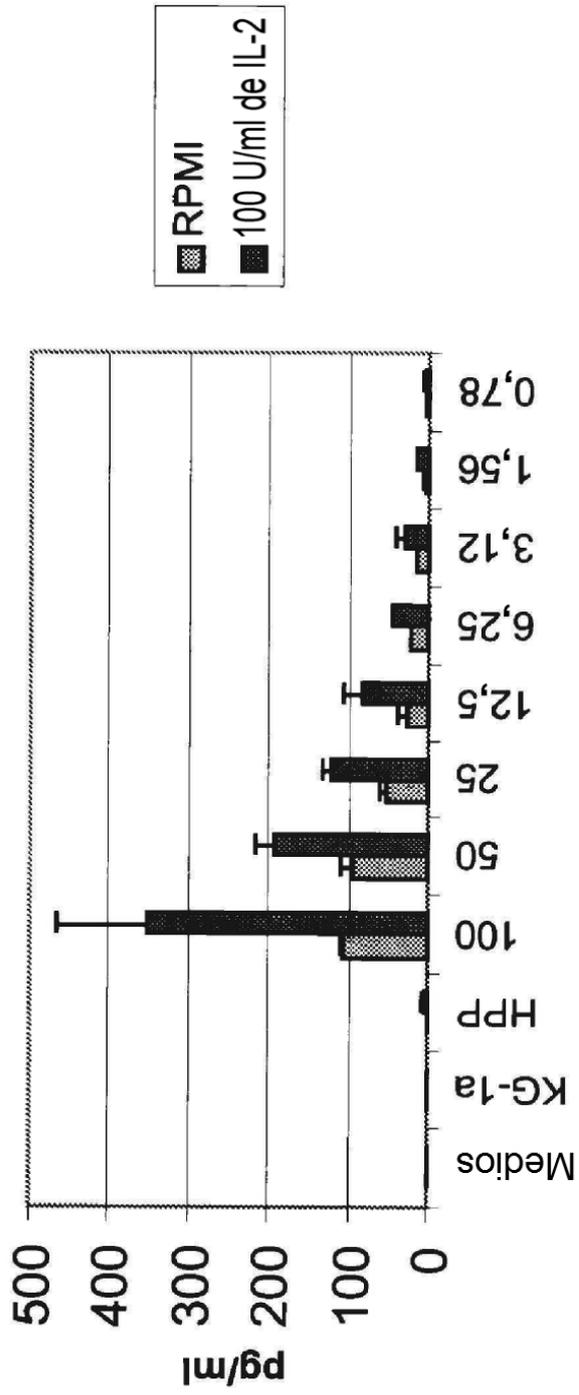
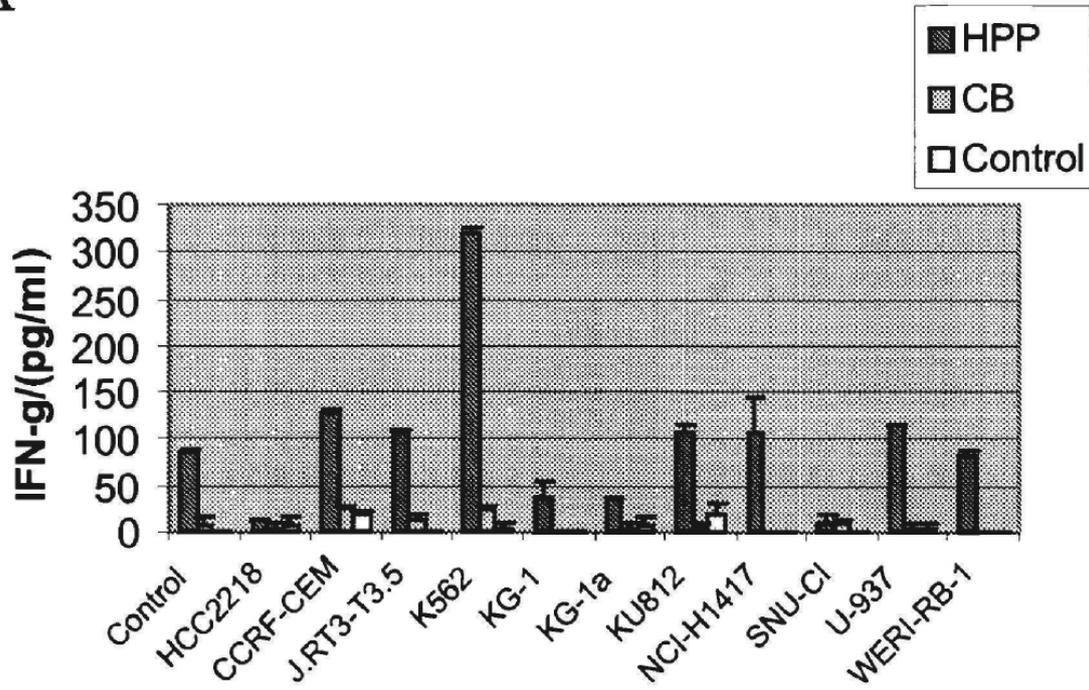
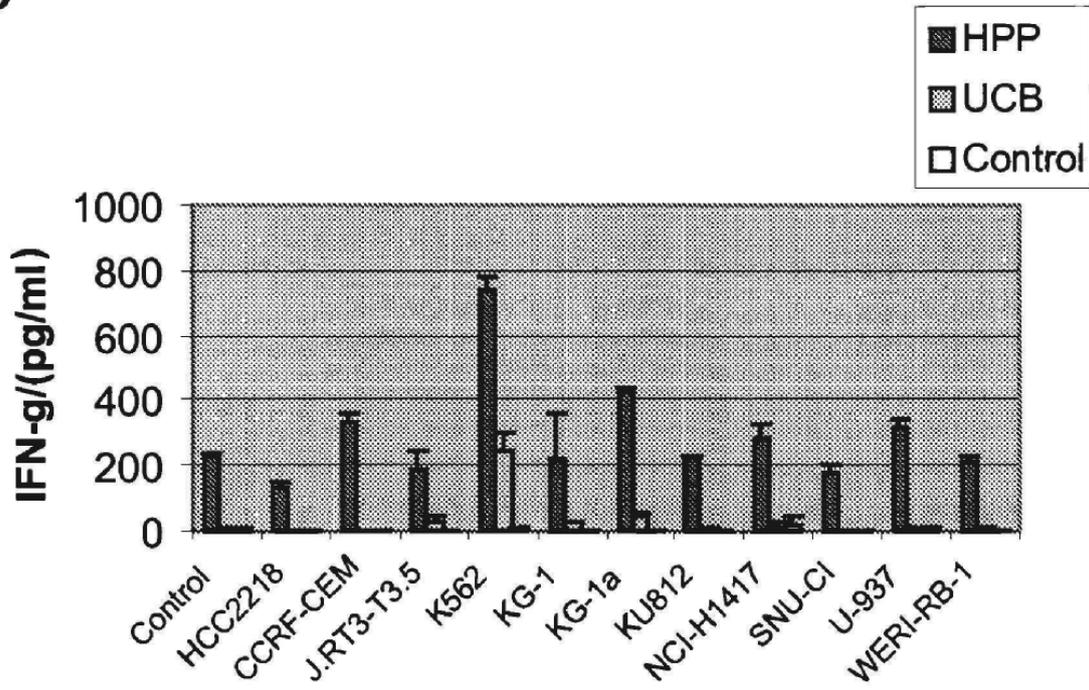


FIG. 9

A



B



FIGS. 10A, 10B

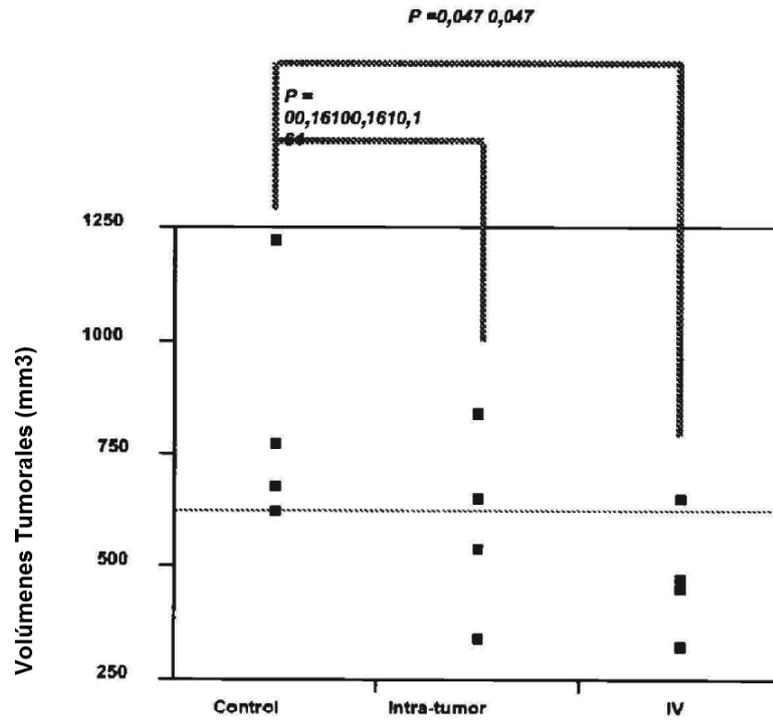


FIG. 11