



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2203176 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

A61K 35/50 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2015.05.04
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.11.26
(86)	Europeisk søknadsnr	08834753.9
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.09.29
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.07.07
(30)	Prioritet	2007.09.28, US, 995763 P 2008.08.20, US, 90555 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA MK RS
(73)	Innehaver	Anthrogenesis Corporation, 7 Powder Horn Drive, Warren, NJ 07059, US-USA
(72)	Oppfinner	ZHANG, Xiaokui, 10 Mounthaven Drive, Livingston, NJ 07039, US-USA VOSKINARIAN-BERSE, Vanessa A., 57 Greenwood Avenue 1, MadisonNJ 07940, US-USA KANG, Lin, 1106 Timber Oaks Road, EdisonNJ 08820, US-USA PADLIYA, Neerav Dilip, 212 Country Club Lane, Scotch PlainsNJ 07076, US-USA HARIRI, Robert, 341 Mendham Road, Bernardsville, NJ 07924, US-USA HEIDARAN, Mohammad A., 8005 Lakenheath Way, Potomac, MD 20854, US-USA PAL, Ajai, 1 LeVan Court, Bridgewater, NJ 08807, US-USA ZEITLIN, Andrew, 29 Riverside Drive, Basking Ridge, NJ 07920, US-USA
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Tumorundertrykking ved anvendelse av humant placentaperfusat og humane placentaderiverte intermediære naturlige dreperceller
(56)	Anførte publikasjoner	US-A1- 2003 068 306 US-A1- 2007 041 954 US-B2- 7 045 148 US-B2- 7 255 879 TAKAHASHI E ET AL: "Induction of CD16(+) CD56(bright) NK cells with antitumour cytotoxicity not only from CD16(-) CD56(bright) NK cells but also from CD16(-) CD56(dim) NK cells" SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 65, no. 2, February 2007 (2007-02), pages 126-138, XP002528954 ISSN: 0300-9475 ROUSSEV R G ET AL: "Phenotypic characterization of normal human placental mononuclear cells" JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE IRELAND LTD, IE, vol. 25, no. 1, 1 September 1993 (1993-09-01), pages 15-29, XP023688512 ISSN: 0165-0378 [retrieved on 1993-09-01]

**TUMORUNDERTRYKKING VED ANVENDELSE AV HUMANT
PLACENTAPERFUSAT OG HUMANE PLACENTADERIVERTE
INTERMEDIÆRE NATURLIGE DREPERCELLER**

5 **[0001]** Denne søknaden krever fordel av amerikansk foreløpig patentsøknad nr. 60/995,763, innlevert 28. september 2008 og amerikansk foreløpig patentsøknad nr. 61/090,555, innlevert 21. august 2008.

1. OMRÅDE

10

15

20

[0002] Heri offentliggjøres fremgangsmåter for undertrykking av veksten eller proliferasjonen av tumorceller ved å sette tumorcellene i kontakt med, placentaperfusat, placentaperfusatderivate celler, naturlige dreperceller fra placenta, *f.eks.* fra placentaperfusat og/eller kombinerte naturlige dreperceller omfattende naturlige dreperceller fra placenta, *f.eks.* fra placentaperfusat og naturlige dreperceller fra navlestrengblod. Heri offentliggjøres også fremgangsmåter for fremstilling av en unik populasjon av naturlige dreperceller fra placenta *f.eks.* fra placentaperfusat, *f.eks.* humant placentaperfusat. Videre offentliggjøres heri også fremgangsmåter for anvendelse av placentaperfusatet og de naturlige drepercellene derfra, for undertrykking av proliferasjonen av tumorceller.

2. BAKGRUNN

25

30

35

[0003] Placentaperfusat omfatter en samling av placentaceller innhentet ved å føre en perfusjonsløsning gjennom vaskulaturen i placenta, og innsamling av perfusjonsvæsken fra vaskulaturen, fra morsoverflaten av placenta, eller begge deler. Fremgangsmåter for perfusjon av placenta fra pattedyr beskrives *f.eks.* i amerikansk patent nr. 7,045,146 og amerikansk patent nr. 7,255,879. Populasjonen av placentaceller oppnådd ved perfusjon er heterogen, og omfatter hematopoietiske (CD34⁺) celler, nukleerte celler som granulocytter, monocytter og makrofager, en liten prosentandel (mindre enn 1 %) vevskultur fra substratvedheftede placentastamceller og naturlige dreperceller. Ingen har hittil beskrevet anvendelsen av placentaperfusat eller populasjoner av placentaceller fra perfusat i undertrykking av tumorcelleproliferasjon.

[0004] Naturlige dreperceller (NK-celler) er cytotoksiske lymfocytter som utgjør en hovedkomponent i det medfødte immunsystemet. NK-celler uttrykker ikke T-celle-

antigenreseptorer (TCR), CD3 eller overflateimmunglobulin (Ig)-B-cellereseptor, men uttrykker vanligvis overflatemarkørene CD16 (FcγRIII) og CD56 hos mennesker. NK-celler er cytotoksiske – små korn i cytoplasmaet deres inneholder spesialproteiner, for eksempel perforin og proteaser kalt granzymmer. Ved frisetting nær en celle merket for dreping, danner perforin porer i cellemembranen til målcellen, som granzymmer og tilknyttede molekyler kan bevege seg gjennom, inkludert apoptose. Ett granzym, granzym B (også kalt granzym 2 og cytotoksisk T-lymfocytforbundet serinesterase 1), er en serinprotease av avgjørende betydning for rask induksjon av målcelleapoptose i cellemidert immunrespons.

[0005] NK-celler aktiveres som respons på interferon- eller makrofagderiverte cytokiner. Aktiverte NK-celler kalles også lymfokinaktivererte (LAK)-celler. NK-celler besitter to typer overflatereseptorer, merket «aktiverende reseptorer» og «inhibitoriske reseptorer», som kontrollerer cellens cytotoksiske aktivitet.

[0006] Anvendelsen av en sammensetning omfattende placentaderivert vevsekstrakt eller CD34⁺-celler fra navlestrengblod eller placentavev for induksjon av kreftcelledifferensiering inn i celler med redusert malignitet eller uten malignitet, som offentliggjort i amerikansk patentsøknad nr. 2007/0041954.

[0007] Amerikansk patentsøknad nr. 2003/068306 vedrører et middel og en fremgangsmåte for ekspandering av naturlige dreperceller som uttrykker fenotypen CD56⁺CD3⁻, der de naturlige drepercellene kan anskaffes fra en hvilken som helst vanlig kilde, fortrinnsvis fra perifert blod, ryggmarg, navlestrengblod, cellelinjer eller cytokinstimulert perifert blod.

[0008] Takahashi E. et al, 2007, Scandinavian Journal of Immunology 65, 126-138, beskriver anvendelsen av forskjellige cytokiner for induksjonen av antitumor-cytotoksisitet i CD16⁺CD56^{lyse} naturlige dreperceller tatt fra perifert blod.

[0009] Roussev R.G. et al, 1993. Journal of Reproductive Immunology 25: 15-29, vedrører fenotypekarakteriseringen av normale humane mononukleære leukocytter fra placenta.

[0010] Blant andre aktiviteter spiller NK-celler en rolle i vertens avvising av tumorer. Fordi kreftceller har redusert eller ingen klasse I MHC-ekspresjon, kan de bli mål for NK-celler. Akkumulering av kliniske data antyder at haploidentisk

transplantasjon av humane NK-celler isolert fra PBMC eller ryggmarg, formidler potente anti-leukemivirkninger uten å gi registrerbar transplantat-mot-vert-sykdom (GVHD). Se Ruggeri et al., Science 295:2097-2100 (2002)). Naturlige dreperceller kan aktiveres av celler som mangler eller viser reduserte nivåer av primære histokompatibilitetskompleks (MHC)-proteiner. Aktiverte og ekspanderte NK-celler og LAK-celler har blitt anvendt i både *ex vivo*-terapi og *in vivo*-terapi for pasienter med fremskredet kreft, med en viss suksess mot beinmargrelaterte sykdommer, f.eks. leukemi, brystkreft og visse typer lymfom. LAK-cellebehandling krever at pasienten først mottar IL-2, etterfulgt av leukoforese og deretter en *ex vivo* inkubasjon og dyrking av de høstede histologiske blodcellene i nærvær av IL-2 i noen dager. LAK-cellene må reinfunderes sammen med relativt høye doser av IL-2 for å fullføre behandlingen. Denne utrensende behandlingen er dyr og kan ha alvorlige bivirkninger. Disse inkluderer væskeretensjon, lungeødem, fall i blodtrykk og høy feber.

[0011] Til tross for de fordelaktige egenskapene ved NK-celler i drap av tumorceller og virusinfiserte celler, er de fortsatt vanskelige å arbeide med og anvende i immunterapi, hovedsakelig fordi det er vanskelig å opprettholde deres tumorrettende og tumordrepende evner under dyrking og ekspansjon. Det er således behov for nye teknikker for enkelt å kunne tilføre naturlige dreperceller.

3. SAMMENDRAG

[0012] Den gjeldende oppfinnelsen vedrører humane nukleære placentaperfusatceller for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av en tumor hos et individ der de humane nukleerte placentaperfusatcellene omfatter CD56⁺, CD16⁻ intermediære naturlige dreperceller fra placenta og kan oppnås ved perfusjon av human placenta som har blitt tappet for navlestrengblod og skylt for å fjerne gjenværende blod for å produsere placentaperfusat omfattende nukleerte placentaceller; og isolering av de nukleerte placentacellene fra placentaperfusatet.

[0013] Den gjeldende oppfinnelsen vedrører human CD56⁺, CD16⁻ intermediære naturlige dreperceller fra placenta for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av en tumor hos et individ der de intermediære naturlige dreperceller fra placenta uttrykker ett eller flere mikroRNA 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 eller hsa-miR-99a ved et registrerbart høyere nivå enn perifere naturlige dreperceller fra blod.

5 **[0014]** Til slutt vedrører den gjeldende oppfinnelsen kombinerte naturlige dreperceller for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av en tumor hos et individ der kombinerte naturlige dreperceller omfatter CD56⁺, CD16⁻ intermediære naturlige dreperceller fra placenta isolert fra placentaperfusat og naturlige dreperceller isolert fra navlestrengblod, og der navlestrengblodet er
10 isolert fra placenta som placentaperfusatet kommer fra, der intermediære naturlige dreperceller fra placenta uttrykker ett eller flere av mikroRNA 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-
15 520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618 eller hsa-miR-99a ved et registrerbart høyere nivå enn naturligere dreperceller fra perifert blod.

[0015] Heri tilveiebringes anvendelsen av humant placentaperfusat; celler fra placentperfusat, *f.eks.* totalt antall nukleære celler fra placentperfusat; kombinasjoner av placentaperfusatceller og celler fra navlestrengblod; og/eller naturlige dreperceller fra placenta *f.eks.* naturlige dreperceller fra placentaperfusat eller naturlige dreperceller oppnådd ved fordøyelse av placentavev, for å undertrykke tumocelleproliferasjon, der de humane placentaperfusatcellene omfatter CD56⁺, CD16⁻ intermediære naturlige dreperceller fra placenta.

25 **[0016]** I ett aspekt tilveiebringes det heri en fremgangsmåte for undertrykking av proliferasjonen av en tumorcelle eller populasjon av tumorceller, som omfatter å sette tumorcellen eller populasjonen av tumorceller i kontakt med humane placentaperfusatceller omfattende CD56⁺, CD16⁻ intermediære naturlige
30 dreperceller fra placenta. I en spesifikk utførelsesform av denne fremgangsmåten er tumorcellen en blodkreftcelle. I en annen spesifikk utførelsesform er tumorcellene blodkreftceller. I en annen spesifikk utførelsesform er tumorcellen en solid tumorcelle. I en annen spesifikk utførelsesform er tumorcellene solide tumorceller. I en annen utførelsesform er tumorcellen en primær duktal karsinomcelle, en
35 leukemicelle, en akutt T-celleleukemicelle, en kronisk myeloidlymfom (CML)-celle, en akutt myelogen leukemicelle, en kronisk myelogen leukemi (CML)-celle, en lungekarsinomcelle, en kolonadenokarsinomcelle, en histiocyttisk lymfomcelle, en

myelomatosecelle, en retinoblastomacelle, en kolorektalt karsinomcelle eller en kolorektal adenokarsinomcelle. I en annen spesifikk utførelsesform finner kontakten sted *in vitro*. I en annen spesifikk utførelsesform finner kontakten sted *in vivo*. I en mer spesifikk utførelsesform finner *in vivo*-kontakten sted i et menneske.

5

[0017] I en annen spesifikk utførelseform er det humane placentaperfusatet perfusert som har passert gjennom vaskulatur i placenta, *f.eks.* kun gjennom placentavaskulaturen. I en annen spesifikk utførelsesform har placentaperfusatet blitt ført gjennom placentavaskulaturen og samlet opp fra morssiden av placenta. I en annen spesifikk utførelsesform er alle eller nærmest alle (*f.eks.* mer enn 90 %, 95 %, 98 % eller 99 %) av alle celler i et placentaperfusat fosterceller. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter placentaperfusatet både fosterceller og morceller. I en mer spesifikk utførelsesform omfatter fostercellene i placentaperfusatet mindre enn omtrent 90 %, 80 %, 70 %, 60 % eller 50 % av cellene i perfusatet. I en annen spesifikk utførelsesform oppnås perfusatet ved å føre en 0,9 % NaCl-løsning gjennom placentavaskulaturen. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter perfusatet et dyrkingsmedium. I en annen spesifikk utførelsesform har perfusatet blitt behandlet for å fjerne et mangfold av erytrocytter.

10

15

20

25

30

35

[0018] I et annet aspekt tilveiebringes det heri en fremgangsmåte for undertrykking av proliferasjonen av en tumorcelle eller mangfold av tumorceller, som omfatter å sette tumorcellen eller mangfoldet av tumorceller i kontakt med humane placentaperfusatceller omfattende CD56⁺, CD16⁻intermediære naturlige dreperceller fra placenta. I en annen spesifikk utførelsesform er eller omfatter dette mangfoldet av placentaperfusatceller totalt nukleerte celler fra placentaperfusat. I en annen spesifikk utførelsesform har placentaperfusatet eller placentaperfusatcellene, *f.eks.* totalt nukleerte celler fra placentaperfusat blitt behandlet for å fjerne minst én celletype. I en annen spesifikk utførelsesform finner kontakten sted *in vitro*. I en annen spesifikk utførelsesform finner kontakten sted *in vivo*. I en mer spesifikk utførelsesform finner *in vivo*-kontakten sted i et pattedyr, *f.eks.* et menneske. Ifølge oppfinnelsen har placentaperfusatcellene blitt behandlet for anriking av CD56⁺CD16⁻ naturlige dreperceller, *f.eks.* intermediære naturlige dreperceller fra placenta (PINK), *f.eks.* oppnådd fra placentaperfusatceller eller placentaceller oppnådd ved mekanisk eller enzymatisk oppbryting av placentavev. I en annen spesifikk utførelsesform velges CD56⁺CD16⁻-celler av CD56-konjugerte mikrokuler. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter

CD56⁺ CD16⁻-celler som viser registrerbart lavere ekspresjon av NKG2D, NKp46 eller CD94 enn et ekvivalent antall CD56⁺CD16⁺ naturlige dreperceller. I en annen spesifikk utførelsesform er PINK-cellene CD3⁻. I en mer spesifikk utførelsesform er minst 50 % i placentaperfusatcellene CD56⁺ CD16⁻-celler. I en mer spesifikk utførelsesform, der CD56⁺ CD16⁻-celler er minst 50 % av placentaperfusatceller, er tumorcellen en primær ductal karsinomcelle, en leukemicelle, en akutt T-celleleukemicelle, en kronisk myeloidlymfom (CML)-celle, en akutt myelogen leukemicelle, en kronisk myelogen leukemi (CML)-celle, en lungekarsinomcelle, en kolonadenokarsinomcelle, en histiocyttlymfomcelle, myelomatosecelle, en retinoblastomacelle, en kolorektal karsinomcelle eller en kolorektal adenokarsinomcelle. I spesifikke utførelsesformer finner kontakten sted *in vitro*. I en annen utførelsesform finner kontakten sted *in vivo*, *f.eks.* i et pattedyr, *f.eks.* et menneske.

[0019] I et annet aspekt tilveiebringes heri en fremgangsmåte for undertrykking av en tumorcelle eller et mangfold av tumorceller omfattende å sette tumorcellen eller mangfoldet av tumorceller i kontakt med et mangfold av CD56⁺CD16⁻ naturlige dreperceller fra placenta, *f.eks.* PINK-celler. I en spesifikk utførelsesform er de naturlige drepercellene fra placenta naturlige dreperceller oppnådd fra humant placentaperfusat. I en annen spesifikk utførelsesform er de naturlige drepercellene naturlige dreperceller oppnådd ved fysisk forstyrrelse og/eller enzymatisk fordøying av placentavev. I en annen spesifikk utførelsesform velges de naturlige drepercellene *f.eks.* fra placentaperfusatceller eller celler oppnådd ved fysisk forstyrrelse og/eller enzymatisk fordøying av placentavev med CD56-konjugerte mikrokuler. I en annen spesifikk utførelsesform er de naturlige drepercellene CD3⁻. I en spesifikk utførelsesform er mangfoldet dreperceller minst 80 % av cellene i en populasjon av celler som omfatter de naturlige drepercellene. I en annen spesifikk utførelsesform finner kontakten sted *in vitro*. I en annen spesifikk utførelsesform finner kontakten sted *in vivo*. I en mer spesifikk utførelsesform finner *in vivo*-kontakten sted i et pattedyr, *f.eks.* et menneske.

[0020] I en annen spesifikk utførelsesform av fremgangsmåten omfatter mangfoldet av humane CD56⁺CD16⁺ naturlige dreperceller, celler som viser registrerbart lavere ekspresjon av NKG2D, NKp46 eller CD94 enn et ekvivalent antall CD56⁺CD16⁺ naturlige dreperceller. I en annens spesifikk utførelsesform uttrykker mangfoldet av naturlige dreperceller, *f.eks.* PINK-celler ett eller flere av mikroRNA 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 og/eller hsa-miR-99a ved et registrerbart høyere nivå enn naturlige dreperceller fra perifert blod.

5

[0021] I en annen spesifikk utførelsesform settes mangfoldet av humane CSD56+CD16- naturlige dreperceller *f.eks.* PINK-celler i kontakt med en immunmodulerende forbindelse i en mengde og for en tidsrom tilstrekkelig til at mangfoldet av naturlige dreperceller kan uttrykke registrerbart mer granzym B enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller som ikke er satt i kontakt med den immunmodulerende forbindelsen. I en mer spesifikk utførelsesform er den immunmodulerende forbindelsen lenalidomid eller pomalidomid. I en annen spesifikk utførelsesform settes mangfoldet av naturlige dreperceller *f.eks.* PINK-celler i kontakt med en immunmodulerende forbindelse i en mengde og for en tidsrom tilstrekkelig til at mangfoldet av naturlige dreperceller kan uttrykke registrerbart mer cytoksisitet mot tumorcellene enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller som ikke er satt i kontakt med den immunmodulerende forbindelsen, *f.eks.* lenalidomid eller pomalidomid. I en annen spesifikk utførelsesform uttrykker mangfoldet av naturlige dreperceller, *f.eks.* PINK-celler ett eller flere av BAX, CCL5, CCR5, CSF2, FAS, GUSB, IL2RA eller TNFRSF18 ved et høyere nivå enn et ekvivalent antall av de naturlige drepercellene som ikke er i kontakt med den immunmodulerende forbindelsen. I en annen spesifikk utførelsesform uttrykker mangfoldet av naturlige dreperceller, *f.eks.* PINK-celler ett eller flere av ACTB, BAX, CCL2, CCL3, CCL5, CCR5, CSF1, CSF2, ECE1, FAS, GNLY, GUSB, GZMB, ILIA, IL2RA, IL8, IL10, LTA, PRF1, PTGS2, SKI, og TBX21 ved et høyere nivå enn et ekvivalent antall av de naturlige drepercellene som ikke er satt i kontakt med den immunmodulerende forbindelsen.

10

15

20

25

30

35

[0022] I en annen utførelsesform kombineres de human CD56+CD16- naturlige drepercellene fra placenta med naturlige dreperceller fra en annen kilde, *f.eks.* placentablod og/eller navlestrengblod, *f.eks.* for å danne kombinerte naturlige dreperceller. Betegnelsen «naturlige drepercelle(r) fra placenta», som anvendt heri, inkluderer ikke naturlige dreperceller fra navlestrengblod eller placentablod. I mer spesifikke utførelseformer kombineres naturlige dreperceller fra placenta med naturlige dreperceller fra annen kilde i et forhold på omtrent 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 eller lignende.

- 5 **[0023]** I spesifikke utførelsesformer dyrkes ikke de kombinerte naturlige drepercellene, og omfatter: et registrerbart høyere antall $CD3^+CD56^+CD16^-$ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod; et registrerbart lavere antall $CD3^+CD56^+CD16^+$ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod; et registrerbart høyere antall $CD3^+$
- 10 $CD56^+KIR2DL2/L3^+$ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod; et registrerbart lavere antall $CD3^+CD56^+NKp46^+$ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod; et registrerbart høyere antall $CD3^+CD56^+NKp30^+$ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod; et registrerbart høyere
- 15 antall $CD3^+CD56^+2B4^+$ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod; eller et registrerbart høyere antall $CD3^+CD56^+CD94^+$ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod. I andre spesifikke utførelsesformer dyrkes de kombinerte naturlige drepercellene og omfatter: et registrerbart lavere antall $CD3^+CD56^+KIR2DL2/L3^+$ naturlige
- 20 dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod; et registrerbart høyere antall $CD3^+CD56^+NKp46^+$ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod; et registrerbart høyere antall $CD3^+CD56^+NKp44^+$ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod; et registrerbart høyere antall $CD3^+CD56^+NKp30^+$
- 25 naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod.

- [0024]** I en spesifikk utførelseform av de ovennevnte fremgangsmåtene er tumorcellen en celle fra en solid tumor. I en annen spesifikk utførelsesform er tumorcellen en celle fra en væsketumor, *f.eks.* en blodtumorcelle. I mer spesifikke
- 30 utførelsesformer er tumorcellen en primær duktal karsinomcelle, en leukemicelle, en akutt T-celleleukemicelle, en kronisk myeloidlymfom (CML)-celle, en akutt myelogen leukemicelle, en kronisk myelogen leukemi (CML)-celle, en lungekarsinomcelle, en kolonadenokarsinomcelle, en histocyttylymfomcelle, myelomatosecelle, en retinoblastomacelle, en kolorektal karsinomcelle eller en
- 35 kolorektal adenokarsinomcelle.

[0025] I et annet aspekt tilveiebringes heri en sammensetning omfattende isolerte CD56⁺, CD16⁻ naturlige dreperceller, *f.eks.* PINK-celler fra placenta. I en spesifikk utførelsesform isoleres de naturlige drepercellene fra humant placentaperfusat. I en annen spesifikk utførelsesform isoleres naturlige dreperceller fra placenta ved fysisk forstyrrelse og/eller enzymatisk fordøyelse av placentavev. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter de humane CD56⁺CD16⁻ naturlige drepercellene minst 50 % av cellene i sammensetningen. I en spesifikk utførelsesform omfatter de naturlige drepercellene minst 80 % av cellene i sammensetningen. Sammensetningen kan også omfatte isolerte CD56⁺, CD16⁺ naturlige dreperceller. De naturlige drepercellene CD56⁺, CD16⁺ kan være fra et annet individ enn de naturlige drepercellene CD56⁺, CD16⁻. I en annen spesifikk utførelsesform isoleres de naturlige drepercellene CD56⁺, CD16⁻ fra et enkelt individ. I en mer spesifikk utførelsesform omfatter de isolerte naturlige drepercellene CD56⁺, CD16⁻ naturlige dreperceller fra minst to forskjellige individer. I en annen spesifikk utførelsesform ekspanderes de naturlige drepercellene fra placenta, *f.eks.* PINK-cellene.

[0026] I en mer spesifikk utførelsesform omfatter sammensetningen naturlige dreperceller fra placenta og naturlige dreperceller fra en annen kilde. I en spesifikk utførelsesform er den andre kilden ryggmargsblod og/eller navlestrengblod. I en annen spesifikk utførelsesform er den andre kilden perifert blod. I mer spesifikke utførelsesformer kombineres naturlige dreperceller fra placenta med naturlige dreperceller fra annen kilde i et forhold på omtrent 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 eller lignende.

[0027] I en annen spesifikk utførelsesform omfatter sammensetningen isolert placentaperfusat. I en mer spesifikk utførelsesform er placentaperfusatet fra det samme individet som de naturlige drepercellene. I en annen mer spesifikk utførelsesform omfatter placentaperfusatet placentaperfusat fra et annet individ enn de naturlige drepercellene. I en annen spesifikk utførelsesform er alle eller nærmest alle (*f.eks.* mer enn 90 %, 95 %, 98 % eller 99 %) av alle celler i et placentaperfusat fosterceller. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter placentaperfusatet både fosterceller og morceller. I en mer spesifikk utførelsesform omfatter fostercellene i placentaperfusatet mindre enn omtrent

90 %, 80 %, 70 %, 60 % eller 50 % av cellene i perfusatet. I en annen spesifikk utførelsesform oppnås perfusatet ved å føre en 0,9 % NaCl-løsning gjennom placentavaskulaturen. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter perfusatet et dyrkingsmedium. I en annen spesifikk utførelsesform har

5 perfusatet blitt behandlet for å fjerne et mangfold av erytrocytter.

[0028] I en annen spesifikk utførelsesform omfatter sammensetningen humane placentaperfusatceller der de humane placentaperfusatcellene omfatter CD56+, CD16- intermediære naturlige dreperceller fra placenta. I en mer spesifikk

10 utførelsesform er de humane placentaperfusatcellene fra det samme individet som de naturlige drepercellene. I en annen mer spesifikk utførelsesform er placentaperfusatcellene fra et annet individ enn de naturlige drepercellene. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter sammensetningen isolert placentaperfusat og isolerte placentaperfusatceller, der det isolerte placentaperfusatet og de

15 isolerte placentaperfusatcellene er fra forskjellige individer. I en annen spesifikk utførelsesform av en hvilken som helst av de ovennevnte utførelsesformene omfattende placentaperfusat, omfatter placentaperfusatet placentaperfusat fra minst to individer. I en annen mer spesifikk utførelseform av en hvilken som helst

20 av de ovennevnte utførelsesformene omfattende placentaperfusatceller, er de isolerte placentaperfusatcellene fra minst to individer. Sammensetningen kan i tillegg omfatte isolerte PINK-celler, der PINK-cellene er fra et annet individ enn placentaperfusatet eller perfusatcellene.

[0029] Heri offentliggjøres også en fremgangsmåte for isolering av naturlige

25 dreperceller fra placenta, hvilket omfatter å oppnå et mangfold av placentaceller samt å isolere naturlige dreperceller fra mangfoldet av placentaceller. Placentacellene er eller omfatter placentaperfusatceller, *f.eks.* fullstendig nukleerte celler fra placentaperfusat. Mangfoldet av placentaceller kan være eller omfatte placentaceller oppnådd ved mekanisk og/eller enzymatisk fordøyelse av

30 placentavev. Isoleringen kan utføres ved anvendelse av ett eller flere antistoffer. Antistoffet eller antistoffene kan omfatte ett eller flere antistoffer mot CD3, CD16 CD56. Isoleringen kan omfatte isolering av CD56⁺-celler fra CD56⁻-celler i mangfoldet av placentaceller. Mer spesifikt omfatter isoleringen isolering av CD56⁺, CD16⁻ placentaceller fra placentaceller som er CD56⁻ eller CD16⁺. Mer

35 spesifikt omfatter isoleringen isolering av CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻ placentaceller fra placentaceller som er CD56⁻, CD16⁺ eller CD3⁺. Fremgangsmåten for isolering av naturlige dreperceller fra placenta kan resultere i en populasjon placentaceller

som er minst 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % eller minst 99 % CD56⁺, CD16⁻ naturlige dreperceller.

[0030] I visse utførelsesformer av de ovennevnte fremgangsmåtene har placenterfusatcellene blitt ekspandert i kultur. I forskjellige utførelsesformer har cellene blitt ekspandert i minst, omtrent eller mer enn 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 eller 30 dager. I en spesifikk utførelsesform har placenterfusatcellene blitt ekspandert i nærvær av et fôringslag og/eller i nærvær av minst ett cytokin. I en mer spesifikk utførelsesform omfatter fôringslaget K562-celler eller mononukleerte celler fra perifert blod. I en annen mer spesifikk utførelsesform er det minst ene cytokinet interleukin-2.

3.1. Definisjoner

[0031] «Kombinerte naturlige dreperceller», som anvendt heri, er naturlige dreperceller, *f.eks.* fra matchet navlestrengblod og humant placenterfusat, hvor placenterfusatet er tatt fra samme placenta som navlestrengblodet. Naturlige dreperceller fra begge isoleres separat eller samtidig og kombineres.

[0032] «PINK» og «PINK-celler», som anvendt heri, viser til intermediære naturlige dreperceller fra placenta som oppnås fra human placenta, *f.eks.* humant placenterfusat eller placentaev som har blitt mekanisk og/eller enzymatisk brutt opp. Cellene er CD56⁺ og CD16⁻, *f.eks.* som fastsatt av strømningscytometri, *f.eks.* fluorescensaktivert cellesortering ved anvendelse av antistoffer mot CD56 og CD16. PINK-celler innhentes ikke fra navlestrengblod eller perifert blod.

[0033] «Placenterfusat», som anvendt heri, betyr perfusjonsløsning som har passert gjennom minst en del av placenta, *f.eks.* en human placenta, *f.eks.* gjennom placentaavaskulaturen, inkludert et mangfold av celler samlet opp av perfusjonsløsningen i løpet av passeringen gjennom placenta.

[0034] «Placenterfusatceller», som anvendt heri, betyr nukleerte celler, *f.eks.* fullstendig nukleerte celler isolert fra, eller som kan isoleres fra, placenterfusat.

[0035] «Tumorcelleundertrykking», som anvendt heri, betyr «undertrykking av tumorcelleproliferasjon» og lignende, og inkluderer å bremse veksten av

tumorceller, f.eks. ved å drepe én eller flere av tumorcellene i populasjonen av tumorceller, f.eks. ved å sette populasjonen av tumorceller i kontakt med PINK-celler, en cellepopulasjon omfattende PINK-celler, kombinerte naturlige dreperceller, en populasjon av celler omfattende kombinerte naturlige dreperceller, humant placentaperfusat eller lignende.

4. KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

[0036]

FIG. 1 viser resultater fra strømningscytometri ved anvendelse av anti-CD3-antistoffer og anti-CD56-antistoffer for celler valgt med CD56-mikrokuler fra humant placentaperfusat (HPP). Hovedandelen av de isolerte cellene er CD56⁺CD3⁻. FIG. 2 beskriver cytokinproduksjonen for PINK-celler og/eller tumorceller i løpet av en 24-timers kultur. FIG. 2A beskriver sekresjon av interferon-gamma (IFN γ) ved placentaperfusatderiverede intermediære naturlige dreperceller (PINK)-celler alene eller i nærvær av KG-1a-tumorceller. PINK-celler og KG-1a-celler ble dyrket alene eller i kombinasjon i et forhold på 1:1. Y-akse: pikogrammer av IFN γ produsert av kulturene. FIG. 2B beskriver sekresjon av granulocyt-makrofagstimulerende faktor (GM-CSF) ved PINK-celler alene eller i nærvær av KG-1a-tumorceller. PINK-celler og KG-1a-celler ble dyrket alene eller i kombinasjon i et forhold på 1:1. Y-akse: pikogrammer av GM-CSF produsert av kulturene.

FIG. 3 beskriver PINK-cellers cytotoxiskitet mot KG-1a-tumorceller i 24-timers felleskultur i et forhold på 1:1, 5:1, 10:1 eller 20:1 PINK-celler til tumorceller. X-akse: forhold mellom PINK-celler og tumorceller. Y-akse: prosentandel døde tumorceller sammenlignet med tumorceller uten PINK-celler.

FIG. 4 beskriver cytotoxiskitet av NK-celler fra placenta og NK-celler fra perifert blod (PB) dyrket i 21 døgn, mot K562-celler. Feilsøylene står for standardavvik på 4 enheter dyrkede NK-placentaceller eller 3 enheter dyrkede NK-celler fra perifert blod.

FIG. 5 beskriver cytotoxiskitet av helt humant placentaperfusat, som oppnådd fra placenta, mot KG-1a-tumorceller i 24 timers felleskultur i et forhold på 1:1, 5:1, 10:1 eller 20:1 eller 100:1 mellom HPP-celler og tumorceller. X-akse: forhold mellom HPP-celler og tumorceller. Y-akse: prosentandel døde tumorceller sammenlignet med tumorceller uten HPP-celler.

FIG. 6 beskriver cytotoxiskitet for helt humant placentaperfusat (HPP), som oppnådd fra placenta og navlestrengblod (UCB), til KG-1a-tumorceller i 48 timers felleskultur i en serie fortyndinger på 100:1, 50:1, 25:1, 12,5:1, 6,25:1,

3,12:1, 1,56:1 eller 0,78:1 mellom HPP-celler eller UCB-celler og tumorceller. X-akse: forhold mellom HPP-celler eller navlestrengceller og tumorceller. Y-akse: prosentandel døde tumorceller etter 48 timers dyrking sammenlignet med tumorceller uten HPP-celler eller navlestrengceller.

5 FIG. 7 beskriver cytotoksistet for helt humant placentaperfusat, som oppnådd fra placentae til KG-1a-tumorceller i 48 timers felleskultur i en serie fortynninger på 100:1, 50:1, 25:1, 12,5:1, 6,25:1, 3,12:1, 1,56:1 eller 0,78:1 mellom HPP-celler og tumorceller. Perfusat ble enten anvendt som oppsamlet eller stimulert i 24 timer med 100 U/ml eller 1000 U/ml interleukin-2 (IL-2). X-akse: forhold
10 mellom HPP-celler og tumorceller. Y-akse: prosentandel døde tumorceller etter 48 timers dyrking sammenlignet med tumorceller uten HPP-celler.

FIG. 8 beskriver den cytotoksiske effekten av humant placentaperfusat mot et panel av tumorcellelinjer etter dyrking med HPP- eller UCB-celler ved et forhold på 50:1 i forhold til tumorceller. FIG 8A: fellesdyrking i 24 timer. FIG. 8B: fellesdyrking i 48
15 timer. X-akse: tumorcellelinje testet. Y-akse: prosentandel døde tumorceller etter fellesdyrking, sammenlignet med antall tumorceller i fravær av tumorceller.

FIG. 9 beskriver IFN γ -produksjon ved HPP-celler dyrket sammen med KG-1a-tumorceller i forskjellige forhold mellom HPP-celler og tumorceller. X-akse: Eksperimentelle betingelser, inkludert forholdet mellom HPP-celler og tumorceller Y-akse: IFN γ -nivåer per milliliter etter 24 timers fellesdyrking.
20

FIG. 10 Produksjon av IFN γ av HPP- eller UCB-celler i felleskultur med et panel av tumorceller. HPP- eller UCB-celler ble fellesdyrket i et forhold på 50:1 med tumorcellelinjer i 24 timer (FIG. 10A) eller 48 timer (FIG. 10B). IFN γ -nivåer ble fastsatt med en Luminex-analyse (HCYTO-60-K-03, Millipore). X-akse:
25 tumorcellelinje testet. Y-akse: pikogrammer av IFN γ produsert av HPP- eller UCB-celler, sammenlignet med pikogrammer av IFN γ produsert i fravær av tumorceller.

FIG. 11 beskriver reduksjonen i tumorstørrelse ved administrering av 2×10^7 humant placentaperfusat (HPP)-celler til mus med KG-1-celletumorer med volum på omtrent 332 mm³. Intra-tumor - HPP-celler ble injisert direkte inn i
30 det subkutane tumorstedet. IV - HPP-celler administrert intravenøst. Kontroll - administrering kun av bindemiddel. Tumorumfangst i mm³.

5. DETALJERT BESKRIVELSE

35 **[0037]** Den gjeldende oppfinnelsen vedrører humane nukleerte placentaperfusatceller for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av en tumor hos et individ, der de humane nukleerte placentaperfusatcellene omfatter

CD56⁺, CD16⁻ intermediære naturlige dreperceller fra placenta og kan oppnås ved perfusjon av human placenta som har blitt tappet for navlestrengblod og skylt for å fjerne gjenværende blod for å produsere placentaperfusat omfattende nukleerte placentaceller; og isolering av de nukleerte placentacellene fra placentaperfusatet.

5

[0038] Den gjeldende oppfinnelsen vedrører human CD56⁺, CD16⁻ intermediære naturlige dreperceller fra placenta for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av en tumor hos et individ, der de naturlige intermediære drepercellene fra placenta uttrykker ett eller flere mikroRNA 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 eller hsa-miR-99a ved et registrerbart høyere nivå enn perifere naturlige dreperceller fra blod.

15

[0039] Den gjeldende oppfinnelsen vedrører endelig kombinerte naturlige dreperceller for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av en tumor hos et individ, hvor nevnte kombinerte naturlige dreperceller omfatter CD56⁺, CD16⁻ intermediære naturlige dreperceller fra placenta isolert fra placentaperfusat og naturlige dreperceller isolert fra navlestrengblod fra placentaen som placentaperfusatet er tatt fra, der intermediære naturlige dreperceller fra placentaen uttrykker ett eller flere av mikroRNA 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 eller hsa-miR-99a ved et registrerbart høyere nivå enn naturligere dreperceller fra perifert blod.

20

25

[0040] Heri tilveiebringes anvendelsen av placentaperfusat, placentaperfusatceller og/eller placentaperfusatderiverte naturlige dreperceller (PINK)-celler oppnådd fra placenta for å undertrykke veksten eller proliferasjonen av en tumorcelle eller et mangfold av tumorceller. Heri tilveiebringes i særdeleshet naturlige dreper (NK)-celler og populasjoner av NK-celler, isolert fra placentaperfusat, *f.eks.* humant placentaperfusat eller isolert fra placentavev som har blitt brutt opp mekanisk og/eller enzymatisk, fremgangsmåter for innsamling av NK-celler og fremgangsmåter for anvendelse av cellene. Heri tilveiebringes også cellepopulasjoner, *f.eks.* populasjoner av placentaceller, omfattende naturlige

30

35

dreperceller. Fremgangsmåter for innsamling av placentaperfusat og innsamling av celler fra placentaperfusat beskrives i avsnitt 5.1 nedenfor. Placentaperfusatderiverte naturlige dreperceller og fremgangsmåter for innsamling av cellene beskrives i avsnitt 5.2 nedenfor. Fremgangsmåter for anvendelse av placentaperfusat, placentaperfusatderiverte celler eller placentaperfusatderiverte naturlige dreperceller, *dvs.* intermediære naturlige dreperceller, for å undertrykke proliferasjonen av tumorceller, beskrives i avsnitt 5.3 nedenfor.

5.1. Placentaperfusat

5.1.1. Sammensetning for celleinnsamling

[0041] Placentaperfusatet, perfusatcellene og de placentaperfusatderiverte naturlige drepercellene som tilveiebringes heri kan samles inn ved perfusjon av *f.eks.* post-partum placenta fra menneske ved anvendelse av en sammensetning for placentacelleinnsamling. Perfusatet kan samles opp fra placenta ved perfusjon av placentaen med en hvilken som helst fysiologisk akseptabel oppløsning, *f.eks.* en saltløsning, dyrkingsmedium eller en mer kompleks sammensetning for celleinnsamling. En sammensetning egnet for perfusjon av placenta og for innsamlingen og beskyttelsen av perfusatceller, *f.eks.* fullstendige nukleerte placentaperfusatceller eller PINK-celler, beskrives i detalj i tilknyttet amerikansk søknadspublikasjon nr. 2207/0190042.

[0042] Sammensetningen for innsamling av celler kan omfatte en hvilken som helst fysiologisk akseptabel løsning egnet til innsamling og/eller dyrking av stamceller, *f.eks.* en saltløsning (*f.eks.* fosfatbufret saltløsning, Krebs-løsning, modifisert Krebs-løsning, Eagles-løsning, 0,9 % NaCl. osv.), et dyrkingsmedium (*f.eks.* DMEM, H.DMEM, osv.) og lignende.

[0043] Sammensetningen for celleinnsamling kan omfatte én eller flere komponenter som har tendens til å konservere celler fra placenta, *dvs.* forhindre eller forsinke død av celler fra placenta, redusere antallet av celler fra placenta i en populasjon av celler som dør, eller lignende, fra innsamlingstidspunktet til dyrkingstidspunktet. Slike komponenter kan *f.eks.* være en apoptoseinhibitor (*f.eks.* en kaspaseinhibitor eller JNK-inhibitor); en vasodilatator (*f.eks.* magnesiumsulfat, et antihypertensivt legemiddel, atrialt natriuretisk peptid (ANP), adrenokortikotropin, kortikotropinfrisettende hormon,

natriumnitroprussid, hydralazin, adenosintrifosfat, adenosin, indometacin eller magnesiumsulfat, en fosfodiesteraseinhibitor, osv.); en nekroseinhibitor (*f.eks.* 2-(1H-indol-3-yl)-3-pentylamino-maleimid, pyrrolidinditiokarbamat eller klonazepam); en TNF- α -inhibitor og/eller et oksygenbærende perfluorkarbon (*f.eks.* perfluoroktylbromid, perfluordekylbromid osv.).

[0044] Sammensetningen for celleinnsamling kan omfatte ett eller flere vevsnedbrytende enzymer, *f.eks.* en metalloprotease, en serinprotease, en nøytral protease, en RNase eller en DNase eller lignende. Slike enzymer inkluderer blant annet kollagenaser (*f.eks.* kollagenase I, II, III eller IV, en kollagenase fra *Clostridium histolyticum*, osv.); dispase, termolysin, elastase, trypsin, LIBERASE, hyaluronidase og lignende.

[0045] Sammensetningen for celleinnsamling kan omfatte en bakteriedrepende eller bakteriostatisk virkningsfull mengde av et antibiotikum. I visse ikke-begrensede utførelsesformer er antibiotikumet et makrolid (*f.eks.* tobramycin), et cefalosporin (*f.eks.* cefaleksin, cefradin, cefuroksim, cefprozil, cefaklor, cefiksim eller cefadroksil), et klaritromycin, et erytromycin, et penicillin (*f.eks.* penicillin V) eller et kinolon (*f.eks.* ofloksacin, ciprofloksacin eller norfloksacin), et tetrasyklin, et streptomycin osv. I en særlig utførelsesform er antibiotikumet aktivt mot grampositive og/eller gramnegative bakterier, *f.eks.* *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* og lignende.

[0046] Sammensetningen for celleinnsamling kan også omfatte én eller flere av følgende forbindelser: adenosin (ca. 1 mM til ca. 50 mM); D-glukose (ca. 20 mM til ca. 100 mM); magnesiumioner (ca. 1 mM til ca. 50 mM); et makromolekyl med molekylvekt på mer enn 20 000 dalton, i én utførelsesform til tede i en tilstrekkelig mengde til å opprettholde endotelintegritet og cellelevedyktighet (*f.eks.* et syntetisk eller naturlig forekommende kolloid, et polysakkarid som dekstran eller et polyetylenglykol tilstede ved ca. 25 g/l til ca. 100 g/l, eller ca. 40 g/l til ca. 60 g/l); en antioksidant (*f.eks.* butylert hydroksyanisol, butylert hydroksytoluen, glutation, vitamin C eller vitamin E forekommende ved ca. 25 μ M til ca. 100 μ M); et reduksjonsmiddel (*f.eks.* N-acetylcystein forekommende ved ca. 0,1 mM til ca. 5 mM); et middel som forhindrer kalsiuminntrengning i celler (*f.eks.* verapamil forekommende ved ca. 2 μ M til ca. 25 μ M); nitroglyserin (*f.eks.* ca. 0,05 g/l til ca. 0,2 g/l); et antikoaguleringsmiddel, i én utførelsesform forekommende i en tilstrekkelig

mengde til å bidra til forebygging av koagulering av residualblod (*f.eks.* heparin eller hirudin forekommende ved en konsentrasjon på ca. 1000 enheter/l til ca. 100 000 enheter/l); eller en amiloridholdig forbindelse (*f.eks.* amilorid, etylisopropylamilorid, heksametylenamilorid, dimetylamilorid eller isobutylamilorid tilstede ved ca. 1,0 µM til ca. 5 µM).

5.1.2. Innsamling og håndtering av placenta

[0047] Vanligvis gjenvinnes en human placenta kort etter dens utstøtning etter fødselen. I en foretrukket utførelsesform gjenvinnes placentaen fra en pasient etter informert samtykke, og etter at det er ført en komplett sykejournal for pasienten og forbundet med placentaen. Sykejournalen fortsetter fortrinnsvis etter fødselen. En slik sykejournal kan anvendes til å samordne etterfølgende anvendelse av placentaen eller cellene høstet derfra. Celler fra human placenta kan *f.eks.* i lys av sykejournalen anvendes til personlig tilpasset medisin for spedbarnet forbundet med placentaen, eller til foreldre, søsken eller andre slektninger av spedbarnet.

[0048] Før gjenvinning av perfusat fjernes navlestrengblodet og placentablodet. I visse utførelsesformer gjenvinnes navlestrengsblodet i placentaen etter fødselen. Placentaen kan underkastes en konvensjonell gjenvinningsprosess for navlestrengblod. Vanligvis anvendes en nål eller en kanyle, ved hjelp av tyngdekraften, til å tømme placenta for blod (*se f.eks.* Anderson, amerikansk patent nr. 5,372,581; Hessel et al., amerikansk patent nr. 5,415,665). Nålen eller kanylen plasseres vanligvis i navlevenen, og placentaen kan masseres forsiktig for å bidra til å drenere navlestrengsblod fra placentaen. Slik gjenvinning av navlestrengsblod kan utføres kommersielt, *f.eks.* LifeBank Inc Cedar Knolls, N.J ViaCord, Cord Blood Registry og CryoCell. Placentaen skråtømmes fortrinnsvis uten ytterligere manipulering for å begrense vevsforstyrrelse under gjenvinningen av navlestrengsblodet.

[0049] En placenta transporteres typisk fra fødestuen til et annet sted, *f.eks.* et laboratorium, for gjenvinning av navlestrengsblod og innsamling av perfusat. Placentaen transporteres fortrinnsvis i en steril, termisk isolert transportanordning (som holder temperaturen på placentaen 20–28 °C), *f.eks.* ved plassering av placentaen, med klemt proksimal navlestreng, i en steril plastpose med glidelås, som deretter plasseres i en isolert beholder. I en annen utførelsesform transporteres placentaen i en innsamlingspakke for navlestrengblod, hovedsakelig

som beskrevet i amerikansk patent nr. 7,147,626. Placentaen leveres fortrinnsvis til laboratoriet fire til tjuefire timer etter fødselen. I visse utførelsesformer klemmes den proksimale navlestrengen, fortrinnsvis 4–5 cm (centimeter) innenfor innsettingen i placentaplaten før gjenvinning av navletrengblodet. I andre utførelsesformer klemmes den proksimale navlestrengen etter gjenvinning av navlestrengsblod, men før ytterligere prosessering av placentaen.

[0050] Før innsamling av perfusatet kan placentaen oppbevares under sterile betingelser og ved enten romtemperatur eller ved en temperatur på 5 til 25 °C (centigrader). Placentaen kan oppbevares i en periode på mer enn førtiåtte timer, og fortrinnsvis i en periode på fire til tjuefire timer før perfusjon av placentaen for å fjerne eventuelt gjenværende navlestrengsblod. Placentaen oppbevares fortrinnsvis i en antikoaguleringsløsning ved en temperatur på 5 til 25 °C (centigrader). Egnede antikoaguleringsløsninger er velkjente i faget. En løsning av heparin eller warfarinnatrium kan f.eks. anvendes. I en foretrukket utførelsesform omfatter antikoaguleringsløsningen en løsning av heparin (f.eks. 1 % vekt/vekt i 1:1000 løsning). Den eksanguinerte placentaen oppbevares fortrinnsvis i høyst 36 timer før placentaperfusat samles inn.

5.1.3. Placentaperfusjon

[0051] Fremgangsmåter for perfusjon av placenta fra pattedyr offentliggjøres f.eks. i Hariri, amerikansk patent nr. 7,045,148 og 7,255,879 og i amerikansk søknadspublikasjon nr. 2007/0190042 med tittelen «Improved Composition for Collecting and Preserving Organs» (Forbedret sammensetning for innsamling og konservering av organer).

[0052] Perfusat kan oppnås ved passasje av perfusjonsløsning, f.eks. saltløsning, dyrkingsmedium eller sammensetninger for celleinnsamling beskrevet ovenfor gjennom placentavaskulaturen. I én utførelsesform gjennomspyles en pattedyrplacenta ved passasje av perfusjonsløsning gjennom enten navlearterien og navleavenen eller begge. Strømningen av perfusjonsløsning gjennom placentaen kan oppnås ved hjelp av f.eks. skråstrømning inn i placentaen. Perfusjonsløsningen tvinges fortrinnsvis gjennom placentaen ved hjelp av en pumpe, f.eks. en peristaltisk pumpe. Navleavenen kan f.eks. kanyleres med en kanyle, f.eks. en TEFLON®- eller plastkanyle, som er

forbundet med et sterilt forbindelsesapparat, slik som et sterilt rør. Det sterile forbindelsesapparatet forbindes med en perfusjonsmanifold.

[0053] Under forberedelse for perfusjon orienteres placentaen fortrinnsvis slik at navlearterien og navlevenen befinner seg på det høyeste punktet av placentaen. Placentaen kan perfuseres ved passasje av en perfusjonsløsning gjennom placentaavaskulaturen eller gjennom placentaavaskulaturen og omkringliggende vev. I én utførelsesform forbindes navlearterien og navlevenen samtidig med en pipette som er forbundet via en fleksibel kobling med et reservoar med perfusjonsløsningen. Perfusjonsløsningen passerer inn i navlevenen og -arterien. Perfusjonsløsningen eksuderes fra og/eller passerer gjennom veggene i blodkarene inn i det omkringliggende placentaevet og samles opp i en egnet åpen beholder fra den overflaten av placentaen som var festet til morens livmor under svangerskapet. Perfusjonsløsningen kan også introduseres gjennom navlestrengsåpningen og få strømme eller trenge ut av åpningene i veggen på placentaen som var i kontakt med morssiden av livmorsveggen. I en annen utførelsesform passerer perfusjonsløsningen gjennom navlevenene og samles inn fra navlearterien eller passerer gjennom navlearterien og samles inn fra navlevenene, dvs. passerer kun gjennom placentaavaskulaturen (fostervevet).

[0054] I én utførelsesform forbindes f.eks. navlearterien og navlevenen samtidig, f.eks. med en pipette som er forbundet via en fleksibel kobling med et reservoar med perfusjonsløsningen. Perfusjonsløsningen passerer inn i navlevenen og -arterien. Perfusjonsløsningen eksuderes fra og/eller passerer gjennom veggene i blodkarene inn i det omkringliggende placentaevet og samles opp i en egnet åpen beholder fra den overflaten av placentaen som var festet til morens livmor under svangerskapet. Perfusjonsløsningen kan også introduseres gjennom navlestrengsåpningen og få strømme eller trenge ut av åpningene i veggen på placentaen som var i kontakt med den maternale siden av livmorsveggen. Placentaceller som samles inn ved anvendelse av denne fremgangsmåten, som kan henvises til som en «pannemetode», er typisk en blanding av foster- og morceller.

[0055] I en annen utførelsesform passerer perfusjonsløsningen gjennom navlevenene og samles inn fra navlearterien eller passerer gjennom navlearterien og samles inn fra navlevenene. Placentaceller innsamlet ved denne fremgangsmåten, som kan henvises til som en «lukket krets»-metode, er som regel nesten utelukkende fra fostersiden.

[0056] Lukket krets-perfusjonsmetoden kan i én utførelseform gjennomføres som følger. En post-partumplacenta anskaffes innen 48 timer etter fødselen. Navlestrengen klemmes og kuttet ovenfor klemmen. Navlestrengen kan kastes eller kan behandles for gjenvinning *f.eks.* av stamceller fra navlestrengen og/eller for å behandle navlestrengmembranen for fremstilling av biomateriale. Fosterhinnemembranene kan bibeholdes under perfusjon eller kan skilles fra fosterhinnen, *f.eks.* ved anvendelse av grovdisseksjon med fingrene. Hvis fosterhinnemembranen skilles fra fosterhinnen før perfusjonen kan den *f.eks.* kastes eller behandles, *f.eks.* for innsamling av stamceller ved enzymatisk fordøyelse eller for å produsere *f.eks.* et fosterhinnebiomateriale, *f.eks.* biomaterialet beskrevet i amerikansk søknadspublikasjon nr. 2004/0048796. Etter rengjøring av placenta for alle synlige blodpropper og gjenværende blod, *f.eks.* ved anvendelse av steril gas, eksponeres navlestrengkarene, *f.eks.* ved delvis kutting av navlestrengmembranen for eksponering av et tverrsnitt av navlestrengen. Karene identifiseres og åpnes, *f.eks.* ved å føre en lukket alligator-klemme gjennom beskjæringsenden på hvert kar. Apparatet, *f.eks.* plastikkslangen koblet til en perfusjonsanordning eller peristaltisk pumpe, føres deretter i hver av placentaarteriene. Pumpen kan være en hvilken som helst pumpe egnet for formålet, *f.eks.* en peristaltisk pumpe. Plastslinger koblet til en steril innsamlingsbeholder, *f.eks.* en blodpose, slik som en 250 ml innsamlingspose, føres deretter inn i placentavenen. Slangene tilkoblet pumpen føres alternativt inn i placentavenen og slanger tilkoblet (et) innsamlingsreservoar(er) føres inn i den ene eller begge placentaarteriene. Placentaen perfunderes deretter med et volum perfusjonsløsning, *f.eks.* omtrent 750 ml perfusjonsløsning. Cellene i perfusatet samles deretter inn, *f.eks.* ved sentrifugering.

[0057] I én utførelsesform klemmes den proksimale navlestrengen under perfusjon og klemmes mer fortrinnsvis innenfor 4–5 cm (centimeter) av navlestrengens innsetting i placentaplaten.

[0058] Den første innsamlingen av perfusjonsvæske fra en pattedyrplacenta under blodfjerningsprosessen er generelt farget med gjenværende røde blodceller av navlestrengsblod og/eller placentablod. Perfusjonsvæsken blir mer fargeløs etter hvert som perfusjonen fortsetter og de gjenværende navlestrengsblodcellene vaskes ut av placentaen. Generelt er fra 30 til 100 ml perfusjonsvæske

tilstrekkelig til innledningsvis å tømme placentaen for blod, men det kan anvendes mer eller mindre perfusjonsvæske avhengig av de observerte resultatene.

[0059] Volumet av perfusjonsvæske anvendt til perfusjon av placentaen kan variere avhengig av antallet av placentaceller som skal samles inn, størrelsen på placentaen, antallet av innsamlinger som skal foretas fra en enkelt placenta osv. I forskjellige utførelsesformer kan volumet perfusjonsvæske være fra 50 ml til 5000 ml, 50 ml til 4000 ml, 50 ml til 3000 ml, 100 ml til 2000 ml, 250 ml til 2000 ml, 500 ml til 2000 ml eller 750 ml til 2000 ml. Typisk gjennomspyles placentaen med 700–800 ml perfusjonsvæske etter eksanguinasjon.

[0060] Placentaen kan gjennomspyles flere ganger over flere timer eller flere dager. Hvis placentaen skal gjennomspyles flere ganger, kan den oppbevares eller dyrkes under aseptiske betingelser i et kar eller annen egnet beholder og gjennomspyles med en sammensetning for celleinnsamling eller en standard perfusjonsløsning (*f.eks.* en normal saltløsning slik som fosfatbufret saltløsning («PBS»)) med eller uten et antikoagulerende middel (*f.eks.* heparin, warfarinnatrium, kumarin, bishydroksykumarin) og/eller med eller uten et antimikrobielt middel (*f.eks.* β -merkaptotetanol (0,1 mM), antibiotika slik som streptomycin (*f.eks.* ved 40–100 μ g/ml), penicillin (*f.eks.* ved 40 U/ml), amfotericin B (*f.eks.* ved 0,5 μ g/ml). I én utførelsesform opprettholdes eller dyrkes isolert placenta i en tidsperiode uten innsamling av perfusatet, slik at placentaen opprettholdes eller dyrkes i 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 eller 24 timer, eller 2 eller 3 eller flere dager før perfusjon og innsamling av perfusat. Den gjennomspylte placentaen kan opprettholdes én eller flere ytterligere ganger, *f.eks.* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 eller flere ganger, og gjennomspyles en andre gang med *f.eks.* 700–800 ml perfusjonsvæske. Placentaen kan gjennomspyles 1, 2, 3, 4, 5 eller flere ganger, *f.eks.* én gang hver 1., 2., 3., 4., 5. eller 6. time. I en foretrukket utførelsesform gjentas perfusjonen av placentaen og innsamlingen av perfusjonsløsning, *f.eks.* sammensetning for celleinnsamling, inntil antallet av gjenvunnede nukleære celler faller under 100 celler/ml. Perfusatene kan på forskjellige tidspunkter prosesseres ytterligere enkeltvis for å gjenvinne tidsavhengige populasjoner av celler, *f.eks.* fullstendig nukleerte celler. Perfusater fra forskjellige tidspunkter kan også slås sammen.

5.1.4. Placentaperfusat og placentaferusatceller

[0061] Placentaperfusat omfatter en heterogen samling av celler. Som regel fjernes erythrocytter fra placentaperfusatet før anvendelse. Slik fjerning kan gjennomføres ved kjente fremgangsmåter for separasjon av røde blodceller fra nukleerte blodceller. I en viss utførelsesform kryopreserveres perfusatet eller perfusatcellene. I visse andre utførelsesformer omfatter placentaperfusatet eller perfusatcellene kun fosterceller, eller en kombinasjon av fosterceller og morceller.

[0062] Placentaperfusat fra en enkel placentaperfusjon omfatter omtrent 100 millioner til omtrent 500 millioner nukleerte celler. I visse utførelsesformer omfatter placentaperfusatet eller perfusatcellene $cd34^{+}$ -celler, *f.eks.* hematopoietiske stem- eller progenitorceller. I en mer spesifikk utførelsesform kan slike celler omfatte $CD34^{+} CD45^{-}$ stem- eller progenitorceller, $CD34^{+}CD45^{+}$ stem- eller progenitorceller, myeloidprogenitorer, lymfoidprogenitorer og/eller erytroidprogenitorer. I andre utførelsesformer omfatter placentaperfusat og placentaperfusatceller vedheftede stamceller fra placenta, *f.eks.* $CD34^{-}$ stamceller. I andre utførelsesformer omfatter placentaperfusatet og placentaperfusatcellene *f.eks.* endotele progenitorceller, osteoprogenitorceller og naturlige dreperceller. I bestemte utførelsesformer omfatter placentaperfusatet som samlet inn fra placenta og depleterte erythrocytter, eller perfusatceller isolert fra slikt perfusat omtrent 6–7 % naturlige dreperceller ($CD3^{-}$, $CD56^{+}$); omtrent 21–22 % T-celler ($CD3^{+}$); omtrent 6–7 % B-celler ($CD19^{+}$); omtrent 1–2 % endotele progenitorceller ($CD34^{+}$, $CD31^{+}$); omtrent 2–3 % nerveprogenitorceller ($nestin^{+}$); omtrent 2–5 % hematopoietiske progenitorceller ($CD34^{+}$); og omtrent 0,5–1,5 % vedheftede placentastamceller (*f.eks.* $CD34^{-}$, $CD117^{-}$, $CD105^{+}$ og $CD44^{+}$), som fastsatt *f.eks.* ved strømningscytometri, *f.eks.* ved FACS-analyse.

5.2. Oppbryting og fordøyelse av placentavev for innsamling av PINK-celler

[0063] Naturlige dreperceller fra placenta, *f.eks.* PINK-celler, kan samles inn fra placentavev som har blitt brutt opp mekanisk og/eller enzymatisk.

[0064] Placentavev kan brytes opp ved anvendelse av ett eller flere vevsnedbrytende enzymer, *f.eks.* en metalloprotease, en serinprotease, en nøytral protease, en RNase eller DNase eller lignende. Slike enzymer inkluderer, men er ikke begrenset til kollagenaser (*f.eks.* kollagenase I, II, III eller IV, en kollagenase fra *Clostridium histolyticum* osv.); dispase, termolysin, elastase,

trypsin, LIBERASE, hyaluronidase og lignende. Etter fordøyelse passerer det fordøyde vevet som regel gjennom en sil eller et filter for å fjerne delvis fordøyde celleklumper, for å etterlate en hovedsakelig enkeltcellet suspensjon.

5 **[0065]** Etter oppnåelse av en suspensjon av placentaceller, kan naturlige dreperceller isoleres ved anvendelse av *f.eks.* antistoffer mot CD3 og CD56. I en spesifikk utførelseform isoleres naturlige dreperceller fra placenta ved valg for celler som er CD56⁺ for å produsere en første cellepopulasjon; sette den første cellepopulasjonen i kontakt med antistoffer spesifikke for CD3 og/eller
10 CD16; og fjerne celler fra den første cellepopulasjonen som er CD3⁺ eller CD56⁺, for slik å produsere en andre cellepopulasjon som hovedsakelig er CD56⁺ og CD3⁻, CD56⁺ og CD16⁻ eller CD56⁺, CD3⁻ og CD16⁻.

15 **[0066]** I én utførelsesform anvendes magnetkuler for anvendelse av naturlige dreperceller fra placenta fra en suspensjon av placentaceller. Cellene kan isoleres *f.eks.* ved anvendelse av en magnetisk aktivert celledatering (MACS)-teknikk, en fremgangsmåte for separasjon av partikler basert på deres kapasitet til å binde magnetiske kuler (*f.eks.* omtrent 0,5–100 µm diameter) som omfatter ett eller flere antistoffer, *f.eks.* anti-CD56-antistoffer. Forskjellige nyttige
20 modifikasjoner kan utføres på de magnetiske mikrosfærene, inkludert kovalent tilsetning av antistoff som spesifikt gjenkjenner et bestemt celleoverflatemolekyl eller -haptent. Kulene blandes deretter med cellene for å tillate binding. Cellene passerer deretter gjennom et magnetfelt for å separere ut celler som har den spesifikke celleoverflatemarkøren. I én utførelsesform kan disse cellene deretter
25 isoleres og blandes på nytt med magnetiske kuler koblet til et antistoff mot ytterligere celleoverflatemarkører. Cellene passerer igjen gjennom et magnetfelt og isolerer celler som binder begge antistoffene. Slike celler kan deretter fortynnes i separate skåler, slik som mikrotiterskåler for klonal isolering.

30 **5.3. Naturlige dreperceller fra placenta**

35 **[0067]** I ett aspekt tilveiebringes heri isoleringen, karakteriseringen og anvendelsen av naturlige dreperceller som kan oppnås fra placenta, *f.eks.* fra placentaperfusat og/eller fra mekanisk og/eller enzymatisk oppbryting av placentavev og sammensetninger omfattende slike naturlige dreperceller. I en spesifikk utførelsesform karakteriseres de naturlige drepercellene fra placenta, «intermediære naturlige dreperceller fra placenta», eller «PINK»-celler, som å

være CD56⁺CD16⁻, *dvs.* at de viser CD56-cellemarkøren og mangler CD16-cellemarkøren, *f.eks.* som fastsatt ved strømningscytometri, *f.eks.* fluorescensaktivert cellesortering ved anvendelse av antistoffer mot CD16 og CD56 som beskrevet ovenfor. Heri tilveiebringes som sådanne isolerte PINK-celler og isolerte mangfold av PINK-celler. Heri tilveiebringes også isolerte mangfold av celler omfattende CD56⁺CD16⁻ PINK-celler i kombinasjon med CD56⁺CD16⁺ naturlige dreperceller. I mer spesifikke utførelsesformer kan de naturlige drepercellene CD56⁺CD16⁺ isoleres fra placenta eller fra en annen kilde, *f.eks.* perifert blod, navlestrengblod, beinmarg eller lignende. I forskjellige andre utførelsesformer kan PINK-celler således kombineres med D56⁺CD16⁺ naturlige dreperceller, *f.eks.* i forhold på *f.eks.* omtrent 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 eller omtrent 9:1. «Isolert», som anvendt i denne sammenhengen, betyr at cellene har blitt fjernet fra sitt normale miljø, *f.eks.* placentaen.

[0068] I bestemte utførelsesformer er PINK-cellene CD3⁻.

[0069] I andre utførelsesformer viser ikke PINK-cellene én eller flere cellemarkører som vises av fullt modne naturlige dreperceller (*f.eks.* CD16), eller viser én eller flere slike markører ved et registrerbart lavere nivå sammenlignet med helt modne naturlige dreperceller, eller viser én eller flere cellemarkører forbundet med prekursorer for naturlige dreperceller, men ikke helt modne naturlige dreperceller. I en spesifikk utførelsesform uttrykker PINK-cellene som tilveiebringes heri NKG2D, CD94 og/eller Npk46 ved et registrerbart lavere nivå enn helt modne NK-celler. I en annen spesifikk utførelsesform uttrykker et mangfold av PINK-celler som tilveiebringes heri, totalt NKG2D, CD94 og/eller NKp46 ved et registrerbart lavere nivå enn et ekvivalent antall fullt modne NK-celler.

[0070] I bestemte utførelsesformer uttrykker PINK-cellene ett eller flere mikroRNA 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 og/eller hsa-miR-99a ved et registrerbart høyere nivå enn naturlige dreperceller i perifert blod.

[0071] I bestemte utførelsesformer ble de naturlige drepercellene fra placenta, *f.eks.* PINK-celler ekspandert ved dyrking. I bestemte andre utførelsesformer ble

placentaperfusatcellene ekspandert ved dyrking. I en spesifikk utførelsesform har placentaperfusatcellene blitt ekspandert i nærvær av et fôringslag og/eller i nærvær av minst ett cytokin. I en mer spesifikk utførelsesform omfatter fôringslaget K562-celler eller mononukleerte celler fra perifert blod. I en annen mer spesifikk utførelsesform er det minst ene cytokinet interleukin-2.

[0072] I en annen utførelsesform tilveiebringes heri et isolert mangfold (*f.eks.* populasjon) av PINK-celler. I en annen spesifikk utførelsesform produseres den isolerte cellepopulasjonen ved CD56-mikrokuleisolering av celler fra placentaperfusat. I forskjellige spesifikke utførelsesformer omfatter populasjonen minst omtrent 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % eller minst omtrent 99 % PINK-celler. I en annen utførelsesform omfatter eller består mangfoldet av PINK-celler av PINK-celler som ikke ekspanderes; *f.eks.* som samlet inn fra placentaperfusat. I en annen utførelsesform omfatter eller består mangfoldet av PINK-celler av PINK-celler som ekspanderes. Fremgangsmåter for ekspandering av naturlige dreperceller har blitt beskrevet *f.eks.* i Ohno et al., amerikansk patentsøknadpublikasjon nr. 2003/0157713; se også Yssel et al., J. Immunol. Methods 72(1):219-227 (1984) og Litwin et al., J. Exp. Med. 178(4):1321-1326 (1993) og beskrivelsen av ekspandering av naturlige dreperceller i eksempel 1 nedenfor.

[0073] I andre utførelsesformer viser det isolerte mangfoldet av PINK-celler ikke én eller flere cellemarkører som vises av fullt modne naturlige dreperceller (*f.eks.* CD16), eller viser én eller flere slike markører ved et registrerbart lavere nivå sammenlignet med helt modne naturlige dreperceller, eller viser én eller flere cellemarkører forbundet med prekursorer for naturlige dreperceller, men ikke forbundet med helt modne naturlige dreperceller. I en spesifikk utførelsesform uttrykker PINK-cellene som tilveiebringes heri NKG2D, CD94 og/eller Np46 ved et registrerbart lavere nivå enn helt modne NK-celler. I en annen spesifikk utførelsesform uttrykker et mangfold av PINK-celler som tilveiebringes heri, totalt NKG2D, CD94 og/eller NKp46 ved et registrerbart lavere nivå enn et ekvivalent antall fullt modne NK-celler.

[0074] I bestemte utførelsesformer uttrykker populasjonen av PINK-celler ett eller flere mikroRNA 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 og/eller hsa-miR-99a ved et registrerbart høyere nivå enn naturlige dreperceller i perifert blod. I en annen spesifikk utførelsesform uttrykker populasjonen av PINK-celler en registrerbart høyere mengde granzym B enn et

5 ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod.

[0075] I andre utførelsesformer ble PINK-cellene som tilveiebringes heri ekspandert ved dyrking. I spesifikke utførelsesformer ble PINK-cellene dyrket, *f.eks.* ekspandert ved dyrking i minst, omtrent eller på det meste 1, 2, 3, 4, 5, 6,

10 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 eller 28 dager. I en spesifikk utførelsesform dyrkes PINK-cellene i omtrent 21 dager.

[0076] I en annen utførelsesform tilveiebringes det heri en isolert cellepopulasjon, *f.eks.* placentaceller, omfattende PINK-celler. I en spesifikk utførelsesform er den isolerte cellepopulasjonen fullstendig nukleerte celler fra placentaperfusat, *f.eks.* placentaperfusatceller, omfattende autologe, isolerte PINK-celler. I en annen spesifikk utførelsesform er den isolerte cellepopulasjonen en isolert cellepopulasjon produsert ved CD56-mikrokuleisolering av celler fra placentaperfusat. I forskjellige spesifikke utførelsesformer omfatter populasjonen

15 minst omtrent 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % eller minst omtrent 99 % PINK-celler.

20

[0077] Fordi post-partumplacenta omfatter vev og celler fra fosteret og fra moren, kan placentaperfusat, avhengig av innsamlingsmetoden, omfatte kun fosterceller, eller en hovedsakelig hovedandel av fosterceller (*f.eks.* høyere enn omtrent 90 %, 95 %, 98 % eller 99 %) eller kan omfatte en blanding av foster- og morceller (*f.eks.* omfatter fostercellene mindre enn omtrent 90 %, 80 %, 70 %, 60 % eller 50 % av fullstendige nukleerte celler fra perfusatet). I én utførelsesform avledes PINK-cellene kun fra placentaceller fra fosteret, *f.eks.* celler innhentet fra lukket kretsperfusjon av placentaen (se ovenfor), der perfusjonen produserer perfusat omfattende en hovedsakelig hovedandel eller kun placentaceller fra fostersiden. I en annen utførelsesform avledes PINK-cellene fra foster- og morceller, *f.eks.* celler oppnådd ved perfusjon ved pannemetoden (se ovenfor) der perfusjonen produserer perfusat omfattende en blanding av foster- og morceller fra placenta. I én

25

30

35 utførelseform tilveiebringes det således heri en populasjon av placenta-deriverte intermediære naturlige dreperceller, hvor den hovedsakelige hovedandelen har en fostergenotype. I en annen utførelsesform tilveiebringes det heri en populasjon av

placenta-deriverte intermediaære naturlige dreperceller som omfatter naturlige dreperceller med fostergenotype og naturlige dreperceller med morgenotype.

[0078] Heri tilveiebringes også populasjoner av placenta-deriverte intermediaære naturlige dreperceller som omfatter naturlige dreperceller fra en ikke-placentakilde. I én utførelsesform tilveiebringes det heri en populasjon av PINK-celler som også omfatter naturlige dreperceller fra navlestrengblod, perifert blod, beinmarg eller en kombinasjon av to eller flere av de foregående. Populasjoner av naturlige dreperceller omfattende PINK-celler og naturlige dreperceller fra en ikke-placentakilde kan omfatte cellene i f.eks. et forhold på omtrent 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 eller omtrent 1:100 og lignende.

[0079] Heri tilveiebringes videre kombinasjoner av navlestrengblod og isolerte PINK-celler. I forskjellige utførelsesformer kombineres navlestrengblod med PINK-celler ved omtrent 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 eller 5×10^8 eller mer PINK-celler per milliliter navlestrengblod.

[0080] Heri tilveiebringes også fremgangsmåter for isolering av PINK-celler. I én utførelsesform samles PINK-celler inn ved å hente inn placentaperfusat og deretter sette placentaperfusatet i kontakt med en sammensetning som spesifikt binder til CD56⁺-celler, f.eks. et antistoff mot CD56, etterfulgt av isolering av CD56⁺-celler på grunnlag av bindingen for å danne en populasjon av CD56⁺-celler. Populasjonen av CD56⁺-celler omfatter en isolert populasjon av naturlige dreperceller. I en spesifikk utførelsesform settes CD56⁺-celler i kontakt med en sammensetning som spesifikt binder til CD16⁺-celler, f.eks. et antistoff mot CD16, og CD16⁺-cellene fra populasjonen av CD56⁺-celler. I en annen spesifikk utførelsesform ekskluderes også CD3⁺-celler fra populasjonen av CD56⁺-celler.

[0081] I én utførelsesform oppnås PINK-celler fra placentaperfusat som følger. Post-partum human placenta eksanguineres og perfunderes, f.eks. med omtrent 200–800 ml perfusjonsløsning kun gjennom placentavaskulaturen. I en spesifikk

utførelsesform tømmes placentaen for navlestrengblod og skylles, *f.eks.* med perfusjonsløsning, gjennom placentavaskulaturen for å fjerne gjenværende blod før perfunderingen. Perfusatet samles opp og behandles for å fjerne eventuelle gjenværende erytrocytter. Naturlige dreperceller i de fullstendig nukleerte cellene i perfusatet kan isoleres på basis av ekspresjon av CD56 og CD16. I visse utførelsesformer omfatter isoleringen av PINK-celler isolering ved anvendelse av et antistoff mot CD56, hvor de isolerte cellene er CD56⁺. I en annen utførelsesform omfatter isoleringen av PINK-celler isolering ved anvendelse av et antistoff mot CD16, hvor de isolerte cellene er CD16⁻. I en annen utførelsesform omfatter isoleringen av PINK-celler isolering ved anvendelse av et antistoff mot CD56, og ekskludering av et mangfold av ikke-PINK-celler ved anvendelse av et antistoff mot CD16, hvor de isolerte cellene omfatter CD56⁺, CD16⁻-celler.

[0082] Celleseparasjon kan oppnås ved en hvilken som helst fremgangsmåte kjent i faget, *f.eks.* fluoroscensaktivert celledatering (FACS), eller fortrinnsvis ved magnetisk celledatering ved anvendelse av mikrokuler konjugert med spesifikke antistoffer. Magnetisk celleseparasjon kan utføres og automatiseres ved anvendelse av *f.eks.* en AUTOMACS™-separator (Miltenyi).

[0083] I et annet aspekt tilveiebringes det her også en fremgangsmåte for isolering av naturlige dreperceller fra placenta, omfattende innsamling av et mangfold av placentaceller og isolering av naturlige dreperceller fra mangfoldet av placentaceller. I en spesifikk utførelsesform er eller omfatter placentacellene placentaperfusatceller, *f.eks.* fullstendig nukleerte celler fra placentaperfusat. I en annen spesifikk utførelsesform er eller omfatter mangfoldet av placentaceller, placentaceller som oppnås ved mekanisk og/eller enzymatisk fordøyelse av placentavev. I en annen utførelsesform utføres isoleringen ved anvendelse av ett eller flere antistoffer. I en mer spesifikk utførelsesform omfatter antistoffet/antistoffene et eller flere av antistoffene mot CD3, CD16 eller CD56. I en mer spesifikk utførelsesform omfatter isoleringen isolering av CD56⁺-celler fra CD56-celler i mangfoldet av placentaceller. I en mer spesifikk utførelsesform omfatter isoleringen isolering av CD56⁺-, CD16⁻-placentaceller, *f.eks.* naturlige dreperceller fra placenta, *f.eks.* PINK-celler, fra placentaceller som er CD56⁻ eller CD16⁺. Mer spesifikt omfatter isoleringen isolering av CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻-placentaceller fra placentaceller som er CD56⁻, CD16⁺ eller CD3⁺. I en annen utførelsesform resulterer fremgangsmåten for isolering av naturlige dreperceller fra placenta i en populasjon placentaceller som er minst

50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % eller minst 99 % CD56⁺, CD16⁻ naturlige dreperceller.

5.4. Naturlige dreperceller fra placenta fra matchet perfusat og navlestrengblod

[0084] Heri tilveiebringes videre naturlige dreperceller oppnådd og oppnåelig fra kombinasjoner av matchede enheter av placentaperfusat og navlestrengblod, henvist til heri som kombinerte naturlige dreperceller. «Matchede enheter», som anvendt heri, angir at NK-cellene oppnås fra placentaperfusatceller og navlestrengblodceller, der navlestrengblodcellene oppnås fra navlestrengblod fra placentaen som placentaperfusatet oppnås fra, dvs. placentaperfusatcellene og navlestrengblodcellene, og dermed at de naturlige drepercellene fra hver av disse, er fra samme individ.

[0085] I visse utførelsesformer omfatter de kombinerte placentadrepercellene kun, eller hovedsakelig kun, naturlige dreperceller som er CD56⁺ og CD16⁻. I visse andre utførelsesformer omfatter de naturlige placenta drepercellene NK-celler som er CD56⁺ og CD16⁻ og NK-celler som er CD56⁺ og CD16⁺. I visse spesifikke utførelsesformer omfatter de kombinerte drepercellene fra placenta minst 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % eller 99,5 % CD56⁺CD16⁻ naturlige dreperceller (PINK-celler).

[0086] I én utførelsesform har de kombinerte naturlige drepercellene ikke vært dyrket. I en spesifikk utførelsesform omfatter de kombinerte naturlige drepercellene et registrerbart høyere antall CD3⁻CD56⁺CD16⁻ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod. I annen en spesifikk utførelsesform omfatter de kombinerte naturlige drepercellene et registrerbart høyere antall CD3⁻CD56⁺CD16⁻ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod. I annen en spesifikk utførelsesform omfatter de kombinerte naturlige drepercellene et registrerbart høyere antall CD3⁻CD56⁺KIR2DL2/L3⁺ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod. I annen en spesifikk utførelsesform omfatter de kombinerte naturlige drepercellene et registrerbart høyere antall CD3⁻CD56⁺ NKp46⁺ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod. I annen en spesifikk utførelsesform omfatter de kombinerte naturlige

drepercellene et registrerbart høyere antall $CD3^+CD56^+$ $NKp30^+$ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod. I annen en spesifikk utførelsesform omfatter de kombinerte naturlige drepercellene et registrerbart høyere antall $CD3^+CD56^+2B4^+$ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod. I annen en spesifikk utførelsesform omfatter de kombinerte naturlige drepercellene et registrerbart høyere antall $CD3^+CD56^+CD94^+$ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod.

[0087] I en annen utførelsesform har de kombinerte naturlige drepercellene vært dyrket, *f.eks.* i 21 dager. I en spesifikk utførelsesform omfatter de kombinerte naturlige drepercellene et registrerbart høyere antall $CD3^+CD56^+KIR2DL2/L3^+$ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod. I en annen spesifikk utførelsesform har de kombinerte naturlige drepercellene ikke vært dyrket. I annen en spesifikk utførelsesform omfatter de kombinerte naturlige drepercellene et registrerbart høyere antall $CD3^+CD56^+Nkp44^+$ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod. I en spesifikk utførelsesform omfatter de kombinerte naturlige drepercellene et registrerbart høyere antall $CD3^+CD56^+Nkp30^+$ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod.

[0088] I en annen utførelsesform uttrykker de kombinerte naturlige drepercellene en registrerbart høyere mengde av granzym B enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod.

[0089] Heri tilveiebringes videre kombinasjoner av navlestrengblod og kombinerte naturlige dreperceller. I forskjellige utførelsesformer kombineres navlestrengblod med kombinerte naturlige dreperceller ved omtrent 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 eller 5×10^8 kombinerte naturlige dreperceller per milliliter navlestrengblod.

5.5. Perfusat/celle-kombinasjoner

[0090] I tillegg til placentaperfusat omfatter placentaperfusatcellene kombinerte naturlige dreperceller og naturlige dreperceller fra placenta, *f.eks.* intermediære naturlige dreperceller fra placenta som tilveiebringes heri, sammensetninger

omfattende perfusatet eller cellene for anvendelse i undertrykkingen av proliferasjonen av en tumorcelle eller et mangfold av tumorceller.

5.5.1. Kombinasjoner av placentaperfusat, perfusatceller og placenta-deriverte intermediære naturlige dreperceller

[0091] Heri tilveiebringes videre sammensetninger omfattende kombinasjoner av placentaperfusat, placentaperfusatceller, intermediære naturlige dreperceller fra placenta og/eller kombinerte naturlige dreperceller beskrevet i avsnitt 5.1, 5.3 eller 5.4 ovenfor. I én utførelsesform tilveiebringes heri f.eks. et volum placentaperfusat supplert med et mangfold av placentaperfusatceller og/eller et mangfold av naturlige dreperceller fra placenta, *f.eks.* intermediære naturlige dreperceller fra placenta eller placentavev med mekanisk eller enzymatisk oppbryting. I spesifikke utførelsesformer suppleres f.eks. hver millimeter placentaperfusat med omtrent 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 eller mer placentaperfusatceller, intermediære naturlige dreperceller fra placenta og/eller kombinerte naturlige dreperceller. I en annen utførelsesform suppleres et mangfold av placentaperfusatceller med placentaperfusat, intermediære naturlige dreperceller fra placenta og/eller kombinerte naturlige dreperceller. I en annen utførelsesform suppleres et mangfold av intermediære naturlige dreperceller med placentaperfusat, placentaperfusatceller og/eller kombinerte naturlige dreperceller. I bestemte utførelsesformer, når perfusatet anvendes for suppling er perfusatvolumet omtrent, mer enn omtrent eller mindre enn omtrent 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 8 %, 6 %, 4 %, 2 % eller 1 % av det totale cellevolumet (i løsning) pluss perfusat. I bestemte andre utførelsesformer, når placentaperfusatceller kombineres med et mangfold PINK-celler og/eller kombinerte naturlige dreperceller, omfatter placentaperfusatcellene generelt omtrent, mer enn omtrent eller mindre enn omtrent 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 8 %, 6 %, 4 %, 2 % eller 1 % av det totale antallet celler. I bestemte andre utførelsesformer, når PINK-celler kombineres med et mangfold placentaperfusatceller og/eller kombinerte naturlige dreperceller, omfatter PINK-cellene generelt omtrent, mer enn omtrent eller mindre enn omtrent 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 8 %, 6 %, 4 %, 2 % eller 1 % av det totale antallet celler. I bestemte andre utførelsesformer, når kombinerte naturlige dreperceller kombineres med PINK-celler og/eller placentaperfusatceller, omfatter de kombinerte naturlige drepercellene generelt omtrent, mer enn omtrent eller mindre enn omtrent 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %,

10 %, 8 %, 6 %, 4 %, 2 % eller 1 % av det totale antallet celler. I bestemte andre utførelsesformer, når PINK-celler, kombinerte naturlige dreperceller eller placentaperfusatceller anvendes til supplering av placentaperfusat, omfatter løsningsvolumet (*f.eks.* saltløsning, dyrkingsmedium eller lignende) som cellene suspenderes i omtrent, mer enn omtrent eller mindre enn omtrent 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 8 %, 6 %, 4 %, 2 % eller 1 % av det totale volumet av perfusat pluss celler, hvor PINK-celler suspenderes til omtrent 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 eller flere celler pr. milliliter før supplering.

[0092] I andre utførelsesformer kombineres enhver av de ovennevnte kombinasjonene i sin tur med navlestrengblod eller nukleerte celler fra navlestrengblod.

[0093] Heri tilveiebringes videre sammenslått perfusat som oppnås fra to eller flere kilder, *f.eks.* to eller flere placentaer, og kombineres, *dvs.* slås sammen. Slikt sammenslått perfusat kan omfatte omtrent like volumer av perfusat fra hver kilde, eller kan omfatte forskjellige volumer fra hver kilde. De relative volumene fra hver kilde kan velges tilfeldig, eller kan baseres på *f.eks.* en konsentrasjon eller mengde av én eller flere cellefaktorer, *f.eks.* cytokiner, vekstfaktorer, hormoner eller lignende; antallet placentaceller i perfusatet fra hver kilde; eller andre egenskaper ved perfusatet fra hver kilde. Perfusat fra flere perfusjoner av den samme placentaen kan slås sammen på lignende måte.

[0094] Heri tilveiebringes på lignende måte placentaperfusatceller og placentaderiverte intermediære naturlige dreperceller, som oppnås fra to eller flere kilder, *f.eks.* to eller flere placentaer, og slås sammen. Slike sammenslåtte celler kan omfatte omtrent likt antall celler fra de to eller flere kildene, eller forskjellig antall celler fra én eller flere av kildene for sammenslåingen. Det relative antallet celler fra hver kilde kan velges basert på *f.eks.* antallet av den ene eller flere spesifikke celletypene i cellene som skal slås sammen, *f.eks.* antallet CD34⁺-celler, antallet CD56⁺-celler osv.

[0095] Sammenslåinger kan omfatte *f.eks.* placentaperfusat supplert med placentaperfusatceller; placentaperfusat supplert med placentaderiverte intermediære naturlige dreper (PINK)-celler; placentaperfusat supplert med både placentaperfusatceller og PINK-celler; placentaperfusatceller supplert med

placentaperfusat; placentaperfusatceller kombinert med PINK-celler; placentaperfusatceller supplert med både placentaperfusat- og PINK-celler; PINK-celler supplert med placentaperfusat; PINK-celler supplert med placentaperfusatceller; eller PINK-celler supplert med både placentaperfusatceller og placentaperfusat.

5

[0096] Heri tilveiebringes videre placentaperfusat, placentaperfusatceller og intermediære naturlige dreperceller fra placenta og sammenslåinger av samme eller kombinasjoner av samme, som har blitt analysert for fastsetting av graden eller mengden av tumorundertrykking (dvs. potens) som kan forventes fra *f.eks.* et gitt antall placentaperfusat- eller PINK-celler eller et gitt perfusatvolum. En alikvot eller et prøveantall celler settes *f.eks.* i kontakt med et kjent antall tumorceller under betingelser der tumorcellene ellers ville proliferere, og raten av proliferasjon av tumorceller i nærvær av placentaperfusat, perfusatceller, naturlige dreperceller fra placenta eller kombinasjoner derav, over tid (*f.eks.* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller 10 uker eller lengre) sammenlignes med proliferasjonen av et ekvivalent antall tumorceller i fravær av perfusat, perfusatceller, naturlige dreperceller fra placenta eller kombinasjoner derav. Potensen for placentaperfusat, placentaperfusatceller og/eller PINK-celler eller kombinasjoner eller sammenslåinger av samme kan uttrykkes som *f.eks.* antall celler eller løsningsvolum som er påkrevd for å undertrykke tumorcellevekst, *f.eks.* med omtrent 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 % eller lignende.

10

15

20

[0097] I bestemte utførelseformer tilveiebringes placentaperfusat, placentaperfusatceller og PINK-celler som administrerbare enheter av farmasøytisk grad. Slike enheter kan tilveiebringes i avgrensede volum, *f.eks.* 100 ml, 150 ml, 200 ml, 250 ml, 300 ml, 350 ml, 400 ml, 450 ml, 500 ml eller lignende. Slike enheter kan tilveiebringes for å oppnå et spesifikt antall av *f.eks.* placentaperfusatceller, intermediære naturlige dreperceller fra placenta eller begge, *f.eks.* 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 , eller flere celler pr. milliliter eller 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} eller flere celler pr. enhet. Slike enheter kan tilveiebringes for å inneholde et spesifikt antall av hvilke som helst av to eller alle tre av placentaperfusat, placentaperfusatceller og/eller PINK-celler.

25

30

35

[0098] I de ovennevnte kombinasjonene av placentaperfusat, placentaperfusatceller og/eller PINK-celler, kan hvilke som helst to eller alle tre av placentaperfusat, placentaperfusatceller og/eller PINK-celler være autologe med en mottaker (dvs. oppnådd fra mottakeren) eller homologe med en mottaker (dvs. oppnås fra minst ett annet individ enn mottakeren).

[0099] Alle ovennevnte kombinasjoner eller sammenslåinger av perfusatceller og/eller placentaperfusat kan omfatte CD56⁺CD16⁺ naturlige dreperceller fra f.eks. placentaperfusat, perifert blod, navlestrengblod, beinmarg eller lignende.

I spesifikke utførelsesformer omfatter kombinasjonene omtrent, minst omtrent eller på det meste omtrent 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 eller mer slike naturlige dreperceller pr. milliliter eller 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} eller flere celler pr. enhet. De naturlige CD56⁺CD16⁺ drepercellene kan anvendes som isolert fra en naturlig kilde, eller kan ekspanderes før inkludering i én av de ovennevnte kombinasjonene eller sammenslåingene. CD56⁺CD16⁺ NK-celler kan være autologe (dvs. oppnås fra det samme individet som placentaperfusatet, placentaperfusatcellene og/eller PINK-cellene; eller oppnås fra en mottaker) eller homologe (dvs. derivert fra et annet individ enn placentaperfusatet, placentaperfusatcellene og/eller PINK-cellene; eller fra et individ som ikke er en mottaker).

[0100] Hver enhet merkes fortrinnsvis for å angi volum, celleantall, celletyper, om enheten har blitt beriket med en bestemt celletype og/eller potensen for et antall celler i enheten, eller et gitt antall pr. millimeter av enheten til å forårsake en målbar undertrykking av proliferasjon av en bestemt type eller typer av tumorceller.

[0101] Heri tilveiebringes også sammensetningen omfattende intermediære naturlige dreperceller, alene eller i kombinasjon med placentaperfusatceller og/eller placentaperfusat. I et annet aspekt tilveiebringes heri således en sammensetning omfattende isolerte CD56⁺, CD16⁻ naturlige dreperceller, der de naturlige drepercellene isoleres fra placentaperfusat og der de naturlige drepercellene omfatter minst 50 % av cellene i sammensetningen. I en spesifikk utførelsesform omfatter de naturlige drepercellene minst 80 % av cellene i sammensetningen. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter sammensetning isolerte naturlige CD56⁺, CD16⁺ dreperceller. I en annen spesifikk utførelsesform er de naturlige CD56⁺, CD16⁺ drepercellene fra et annet individ enn de naturlige CD56⁺, CD16⁻

drepercellene. I en annen spesifikk utførelsesform er de naturlige drepercellene fra ett enkelt individ. I en mer spesifikk utførelsesform omfatter de isolerte naturlige drepercellene naturlige dreperceller fra minst to forskjellige individer. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter sammensetningen isolert placentaperfusat. I en mer spesifikk utførelsesform er placentaperfusatet fra det samme individet som de naturlige drepercellene. I en annen mer spesifikk utførelsesform omfatter placentaperfusatet placentaperfusat fra et annet individ enn de naturlige drepercellene. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter sammensetningen isolerte placentaperfusatceller. I en mer spesifikk utførelsesform er placentaperfusatcellene fra det samme individet som de naturlige drepercellene. I en annen mer spesifikk utførelsesform er placentaperfusatcellene fra et annet individ enn de naturlige drepercellene. I en annen spesifikk utførelseform omfatter sammensetningen i tillegg isolert placentaperfusat og isolerte placentaperfusatceller, der det isolerte placentaperfusatet og de isolerte placentaperfusatcellene er fra forskjellige individer. I en annen spesifikk utførelsesform av en hvilken som helst av de ovennevnte utførelsesformene omfattende placentaperfusat, omfatter placentaperfusatet placentaperfusat fra minst to individer. I en annen mer spesifikk utførelseform av en hvilken som helst av de ovennevnte utførelsesformene omfattende placentaperfusatceller, er de isolerte placentaperfusatcellene fra minst to individer.

5.5.2. Sammensetninger omfattende vedheftede placentastamceller

[0102] I andre utførelseformer suppleres placentaperfusatet, mangfoldet av placentaperfusatceller og/eller mangfoldet av PINK-celler eller en kombinasjon eller sammenslåing av noen av de foregående, med vedheftede placentastamceller. Slike stamceller beskrives *f.eks.* i Hariri amerikansk patent nr. 7,045,148 og 7,255,879. Vedheftede placentastamceller er ikke trofoblaster.

[0103] Placentaperfusatet, mangfoldet av placentaperfusatceller og/eller mangfoldet av PINK-celler eller en kombinasjon eller sammenslåing kan suppleres med *f.eks.* 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 eller flere celler pr. milliliter eller 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^1 , 5×10^1 , 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} eller flere vedheftende placentaceller. De vedheftende placentastamcellene i kombinasjonene kan være *f.eks.* vedheftende placentastamceller som har vært

dyrket i *f.eks.* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, eller 40 fordoblinger av populasjonen eller mer.

5 **[0104]** Vedheftende stamceller fra placenta fester seg, når de dyrkes i primærkultur eller i cellekultur, til vevskultursubstratet, *f.eks.* vevskulturbeholderoverflate (*f.eks.* vevskulturplast). Vedheftende stamceller fra placenta i kultur antar et generelt fibroblastoid, stjerneformet utseende, med atskillige cytoplasmiske prosesser som strekker seg fra det sentrale cellelegemet. Vedheftende stamceller fra placenta er imidlertid morfologisk
10 differensierbare fra fibroblaster dyrket under samme betingelser, da stamceller fra placenta viser et større antall av slike prosesser enn fibroblaster. Morfologisk kan stamceller fra placenta også differensieres fra hematopoietiske stamceller, som generelt antar en mer avrundet, eller brostenformet morfologi i kultur.

15 **[0105]** Vedheftede stamceller fra placenta, og populasjoner av stamceller fra placenta, som er nyttige i sammensetningene og fremgangsmåtene som tilveiebringes heri, uttrykker et mangfold av markører som kan anvendes til å identifisere og/eller isolere stamcellene, eller populasjoner av celler som omfatter stamcellene. De vedheftende placentastamcellene og vedheftede
20 stamcellepopulasjoner nyttige i sammensetningene og fremgangsmåtene som tilveiebringes heri, inkluderer stamceller og stamcelleinneholdende populasjoner oppnådd direkte fra placenta eller del derav (*f.eks.* amnion, korion, amnikorionplaten, placentacotyledoner, navlestreng og lignende). Den vedheftede placentastamcellepopulasjonen er i én utførelsesform en populasjon
25 (dvs. to eller flere) vedheftede placentastamceller i kultur, *f.eks.* en populasjon i en beholder, *f.eks.* en pose.

[0106] Vedheftede stamceller fra placenta uttrykker generelt markørene CD73, CD105, CD200, HLA-G og/eller OCT-4, og uttrykker ikke CD34, CD38 eller CD45.
30 Vedheftende stamceller fra placenta kan også uttrykke HLA-ABC (MHC-1) og HLA-DR. Disse markørene kan anvendes til å identifisere stamceller fra placenta og til å skille stamceller fra placenta fra andre stamcelletyper. Da stamceller fra placenta kan uttrykke CD73 og CD105, kan de ha mesenkymale stamcellelignende egenskaper. Da vedheftede stamceller fra placenta kan uttrykke CD200 og HLA-G,
35 en fosterspesifikk markør, kan de imidlertid skilles fra mesenkymale stamceller, *f.eks.* benmargsderiverte mesenkymale stamceller, som uttrykker verken CD200

eller HLA-G. Mangelen på ekspresjon av CD34, CD38 og/eller CD45 identifiserer således vedheftede stamceller fra placenta som ikke-hematopoietiske stamceller.

5 **[0107]** I én utførelsesform er de vedheftede placentastamcellene CD200⁺, HLA-G⁺, der stamcellene registrerbart undertrykker kreftcelleproliferasjon eller tumorvekst. I en spesifikk utførelsesform er de vedheftede stamcellene også CD73⁺ og CD105⁺. I en annen spesifikk utførelsesform er de vedheftede stamcellene også CD34⁻, CD38⁻ eller CD45⁻. I en mer spesifikk utførelsesform er de vedheftede stamcellene også CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ og CD105⁺. I en annen utførelsesform produserer de
10 vedheftede stamcellene ett eller flere embryolignende legemer når dyrket under betingelser som tillater dannelsen av embryolignende legemer.

15 **[0108]** I en annen utførelsesform er de vedheftede placentastamcellene CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, der stamcellene registrerbart undertrykker kreftcelleproliferasjon eller tumorvekst. I en spesifikk utførelsesform av populasjonene er de vedheftede stamcellene HLA-G⁺. I en annen spesifikk utførelsesform er de vedheftede stamcellene CD34⁻, CD38⁻ eller CD45⁻. I en annen spesifikk utførelsesform er de vedheftede stamcellene CD34⁻, CD38⁻ og CD45⁻. I en mer spesifikk utførelsesform er de vedheftede stamcellene CD34⁻,
20 CD38⁻, CD45⁻ og HLA-G⁺. I en annen spesifikk utførelsesform produserer de vedheftede placentastamcellene ett eller flere embryolignende legemer når dyrket under betingelser som tillater dannelsen av embryolignende legemer.

25 **[0109]** I en annen utførelsesform er de vedheftede placentastamcellene CD200⁺, OCT-4⁺, der stamcellene registrerbart undertrykker kreftcelleproliferasjon eller tumorvekst. I en spesifikk utførelsesform er de vedheftede stamcellene også CD73⁺ og CD105⁺. I en annen spesifikk utførelsesform er de vedheftede stamcellene HLA-G⁺. I en annen spesifikk utførelsesform er de vedheftede stamcellene CD34⁻, CD38⁻ og CD45⁻. I en mer
30 spesifikk utførelsesform er de vedheftede stamcellene CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ og HLA-G⁺. I en annen spesifikk utførelsesform produserer de vedheftede placentastamcellene ett eller flere embryolignende legemer når dyrket under betingelser som tillater dannelsen av embryolignende legemer.

35 **[0110]** I en annen utførelsesform er de vedheftede placentastamcellene CD73⁺, CD105⁺ og HLA-G⁺, der stamcellene registrerbart undertrykker kreftcelleproliferasjon eller tumorvekst. I en spesifikk utførelseform av det

ovennevnte mangfoldet er de vedheftede stamcellene også CD34⁻, CD38⁻ eller CD45⁻. I en annen spesifikk utførelsesform er de vedheftede stamcellene også CD34⁻, CD38⁻ og CD45⁻. I en annen spesifikk utførelsesform er de vedheftede stamcellene også OCT-4⁺. I en annen spesifikk utførelsesform er de vedheftede stamcellene også CD200⁺. I en mer spesifikk utførelsesform er de vedheftede stamcellene også CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ og CD200⁺.

[0111] I en annen utførelsesform er de vedheftede placentastamcellene CD73⁺-, CD105⁺-stamceller, der stamcellene produserer ett eller flere embryolignende legemer under betingelser som tillater dannelsen av embryolignende legemer og hvor de vedheftede stamcellene registrerbart undertrykker kreftcelleproliferasjon eller tumorvekst. I en spesifikk utførelsesform er de vedheftede stamcellene også CD34⁻, CD38⁻ eller CD45⁻. I en annen spesifikk utførelsesform er de vedheftede stamcellene også CD34⁻, CD38⁻ og CD45⁻. I en annen spesifikk utførelsesform er de vedheftede stamcellene også OCT-4⁺. I en mer spesifikk utførelsesform er de vedheftede stamcellene også OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻ og CD45⁻.

[0112] I en annen utførelsesform er de vedheftede placentastamcellene OCT-4⁺-stamceller, der de vedheftede placentastamcellene produserer ett eller flere embryolignende legemer under betingelser som tillater dannelsen av embryolignende legemer og hvori stamcellene har blitt identifisert som registrerbart å undertrykke kreftcelleproliferasjon eller tumorvekst.

[0113] I forskjellige utførelsesformer er minst 10 %, minst 20 %, i det minste 30 %, minst 40 %, minst 50 %, minst 60 %, minst 70 %, minst 80 %, minst 90 % eller minst 95 % av de isolerte placentacellene OCT4⁺-stamceller. I en spesifikk utførelsesform av de ovennevnte populasjonene er stamcellene CD73⁺ og CD105⁺. I en annen spesifikk utførelsesform er stamcellene CD34⁻, CD38⁻ eller CD45⁻. I en annen spesifikk utførelsesform er stamcellene CD200⁺. I en mer spesifikk utførelsesform er stamcellene CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻ og CD45⁻. I en annen spesifikk utførelsesform har populasjonen blitt ekspandert, f.eks. ved passasje minst én gang, minst tre ganger, minst fem ganger, minst 10 ganger, minst 15 ganger eller minst 20 ganger.

[0114] I en mer spesifikk utførelsesform av noen av de ovennevnte utførelsesformene uttrykker placentacellene ABC-p (et placentaspesifikt ABC-transporterprotein; se f.eks. Allikmets et al., Cancer Res. 58(23):5337-9 (1998)).

[0115] I en annen utførelsesform er de vedheftede placentastamcellene CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻ og CD133⁻. I en annen utførelsesform skiller de vedheftede placentastamcellene, placentastamcellene konstitusjonsmessig ut IL-6, IL-8 og monocyttekjemotiltrekkingsprotein (MCP-1).

[0116] Hver av placentastamcellene henvist til ovenfor kan omfatte placentastamceller oppnådd og isolert direkte fra en pattedyrplacenta, eller placentastamceller som har vært dyrket og passert minst 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30 eller flere ganger, eller en kombinasjon derav. Det tumorundertrykkende mangfoldet av vedheftede stamceller fra placenta beskrevet ovenfor kan omfatte omtrent, minst eller ikke mer enn 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} eller flere vedheftede stamceller fra placenta.

5.5.3. Sammensetninger omfattende kondisjonert medium med placentastamceller

[0117] Heri tilveiebringes også anvendelsen av en tumorundertrykkende sammensetning omfattende PINK-celler, placentaperfusat og/eller placentaperfusat og ytterligere kondisjonert medium. Vedheftede placentastamceller, placentaperfusatceller og/eller intermediære naturlige dreperceller fra placenta kan anvendes til å produsere kondisjonert medium som er tumorcelleundertrykkende, dvs. medium omfattende ett eller flere biomolekyler skilt ut eller utsondret av stamcellene, som har en registrerbar tumorundertrykkende virkning på et mangfold av én eller flere typer immunceller. I forskjellige utførelsesformer omfatter det kondisjonerte mediet medium der placentaceller (f.eks. stamceller, placentaperfusatceller, PINK-celler) har vokst i minst 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 eller flere dager. I andre utførelsesformer omfatter det kondisjonerte mediet medium der placentaceller har vokst til minst 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % konfluens, eller opptil 100 % konfluens. Et slikt kondisjonert medium kan anvendes til å støtte dyrkingen av en separat populasjon av placentaceller, eller celler av en annen type. I en annen utførelsesform omfatter det kondisjonerte mediet som tilveiebringes heri medium der vedheftede stamceller fra placenta og ikke-placentastamceller har blitt dyrket.

[0118] Slikt kondisjonert medium kan kombineres med enhver av eller enhver kombinasjon av placentaperfusat, placentaperfusatceller og/eller intermediære naturlige dreperceller fra placenta for å danne en tumorcelleundertrykkende sammensetning. I visse utførelsesformer omfatter sammensetningen mindre enn halvparten kondisjonert medium etter volum, *f.eks.* omtrent, eller mindre enn omtrent 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % eller 1 % etter volum.

[0119] I en utførelsesform tilveiebringes således heri en sammensetning omfattende dyrkingsmedium fra en kultur av placentastamceller hvor placentastamcellene (a) er vedheftet et substrat; (b) uttrykker CD200 og HLA-G, eller uttrykker CD73, CD105, og CD200, eller uttrykker CD200 og OCT-4, eller uttrykker CD73, CD 105, og HLA-G, eller uttrykker CD73 og CD105 og bidrar til dannelsen av ett eller flere embryolignende legemer i en populasjon av placentaceller som omfatter placentastamceller, når populasjonen dyrkes under betingelser som tillater dannelsen av embyolignende legemer, eller uttrykker OCT-4 og bidrar til dannelsen av et eller flere embryolignende legemer i en populasjon av placentaceller som omfatter placentastamcellene når populasjonen dyrkes under betingelser som tillater dannelsen av embryolignende legemer; og (c) registrerbart undertrykker veksten eller proliferasjonen av en tumorcelle eller populasjon av tumorceller. I en spesifikk utførelsesform omfatter sammensetningen videre et mangfold av stamcellene fra placenta. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter sammensetningen et mangfold av ikke-placentaceller. I en mer spesifikk utførelsesform omfatter ikke-placentacellene CD34+-celler, *f.eks.* hematopoietiske progenitorceller, slik som hematopoietiske progenitorceller fra perifert blod, hematopoietiske progenitorceller fra navlestrengblod eller hematopoietiske progenitorceller fra placentablod. Ikke-placentacellene kan også omfatte andre stamceller, slik som mesenkyme stamceller, *f.eks.* beinmargderiverte mesenkyme stamceller. Ikke-placentacellene kan også være én eller flere type voksne celler eller cellelinjer. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter sammensetningen et antiproliferasjonsmiddel, *f.eks.* et anti-MIP-1 α - eller anti-MIP-1 β -antistoff.

[0120] I en spesifikk utførelsesform oppnås placentacellekondisjonert dyrkingsmedium eller supernatant fra et mangfold av placentastamceller dyrket sammen med et mangfold av tumorceller i et forhold på omtrent 1:1, omtrent 2:1, omtrent 3:1, omtrent 4:1 eller omtrent 5:1 placentastamceller til tumorceller. Det kondisjonerte mediet eller supernatanten kan *f.eks.* oppnås

fra en kultur omfattende omtrent 1×10^5 -placentastamceller, omtrent 1×10^6 placentastamceller, omtrent 1×10^7 placentastamceller eller omtrent 1×10^8 placentastamceller eller mer. I en anen spesifikk utførelsesform oppnås det kondisjonerte dyrkingsmediet eller supernatanten fra en felleskultur omfattende omtrent 1×10^5 til omtrent 5×10^5 placentastamceller og omtrent 1×10^5 tumorceller; omtrent 1×10^6 til omtrent 5×10^6 placentastamceller og omtrent 1×10^6 tumorceller; omtrent 1×10^7 til omtrent 5×10^7 placentastamceller og omtrent 1×10^7 tumorceller; eller omtrent 1×10^8 til omtrent 5×10^8 placentastamceller og omtrent 1×10^8 tumorceller.

[0121] I en spesifikk utførelsesform er det kondisjonerte mediet egnet for administrering til et individ med en vekt på 70 kg, omfattende supernatant kondisjonert med omtrent 70 millioner placentastamceller i omtrent 200 ml dyrkingsmedium.

[0122] Kondisjonert medium kan kondenseres for tilberedning av et administrerbart produkt av farmasøytisk grad. Kondisjonert medium kan f.eks. kondenseres til omtrent 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % eller mer ved fjerning av vann, f.eks. ved avdamping, frysetørking eller lignende. I en spesifikk utførelsesform kan f.eks. 200 ml kondisjonert medium fra omtrent 70 millioner placentastamceller kondenseres til et volum på omtrent 80 ml, 160 ml, 140 ml, 120 ml, 100 ml, 80 ml, 60 ml, 40 ml, 20 ml eller mindre. Det kondisjonerte mediet kan også hovedsakelig tørkes, f.eks. til et pulver, f.eks. ved avdamping, frysetørking eller lignende.

5.6. Konservering av perfusat og placentaceller

[0123] Placentaperfusat eller placentaceller, f.eks. perfusatceller, kombinerte naturlige dreperceller og PINK-celler kan konserveres, dvs. plasseres under betingelser som tillater langstidslagring eller under betingelser som inhiberer celledød ved f.eks. apoptose eller nekrose.

[0124] Placentaperfusat kan produseres ved å passere en placentacellesammensetning gjennom minst en del av placentaen, f.eks. gjennom placentavaskulaturen. Sammensetningen for placentacelleinnsamling omfatter én eller flere forbindelser som virker til å konservere cellene inneholdt i perfusatet. En slik sammensetning for placentacelleinnsamling beskrives i avsnitt 5.1 ovenfor,

f.eks. en sammensetning omfattende apoptoseinhibitor, nekroseinhibitor og/eller et oksygenbærende perfluorkarbon, som beskrevet i tilknyttet amerikansk søknad nr. 11/648,812, med tittelen «Improved Composition for Collecting and Preserving Placental Stem Cells and Methods of Using the Composition» innlevert 28.

5

desember 2006. I én utførelsesform er sammensetningen for

placentacelleinnsamling, passert gjennom placentaen eller placentavevet, placentaperfusatet nyttig i fremgangsmåtene beskrevet i avsnitt 5.4 nedenfor.

[0125] I én utførelsesform samles placentaperfusatet og/eller placentacellene inn fra en pattedyr, *f.eks.* human post-partum placenta ved å sette cellene i kontakt med en sammensetning for placentacelleinnsamling omfattende en apoptoseinhibitor og et oksygenbærende perfluorkarbon, hvor apoptoseinhibitoren forekommer i en mengde og i et tidsrom tilstrekkelig til å redusere eller hindre apoptose i populasjonen av stamceller, som sammenlignet med en populasjon av stamceller som ikke settes i kontakt med apoptoseinhibitoren. Placentaen kan *f.eks.* perfunderes med sammensetningen for placentacelleinnsamling, og placentaceller, *f.eks.* fullstendig nukleerte placentaceller isoleres derfra. I en spesifikk utførelsesform er inhibitoren av apoptose en kaspaseinhibitor. I en annen spesifikk utførelsesform er apoptoseinhibitoren en JNK-inhibitor. I en mer spesifikk utførelsesform modulerer ikke JNK-inhibitoren differensiering eller proliferasjon av stamcellene. I en annen utførelsesform omfatter sammensetningen for placentacelleinnsamling apoptoseinhibitoren og det oksygenbærende perfluorkarbonet i separate faser. I en annen utførelsesform omfatter sammensetningen for placentacelleinnsamling apoptoseinhibitoren og det oksygenbærende perfluorkarbonet i en emulsjon. I en annen utførelsesform omfatter sammensetningen for placentacelleinnsamling dessuten en emulgator, *f.eks.* lecitin. I en annen utførelsesform er apoptoseinhibitoren og perfluorkarbonet mellom ca. 0 °C og ca. 25 °C på tidspunktet for opprettelse av kontakt med placentacellene. I en annen mer spesifikk utførelsesform er apoptoseinhibitoren og perfluorkarbonet mellom ca. 2 °C og 10 °C, eller mellom ca. 2 °C og ca. 5 °C på tidspunktet for opprettelse av kontakt med placentacellene. I en annen mer spesifikk utførelsesform utføres opprettelsen av kontakt under transport av populasjonen av stamceller. I en annen mer spesifikk utførelsesform utføres opprettelsen av kontakt under frysing og tining av populasjonen av stamceller.

10

15

20

25

30

35

[0126] I en annen utførelsesform kan placentaperfusatet og/eller placentacellene samles inn og konserveres ved å sette perfusatet og/eller

cellene i kontakt med en apoptoseinhibitor og en organkonserverende forbindelse, der apoptoseinhibitoren forekommer i en mengde og et tidsrom tilstrekkelig til å redusere eller hindre celleapoptose, som sammenlignet med perfusat eller placentaceller som ikke settes i kontakt med apoptoseinhibitoren.

5

[0127] I en spesifikk utførelsesform er den organkonserverende forbindelsen UW-løsning (beskrevet i amerikansk patent nr. 4 798 824, også kjent som VIASPAN™, se også Southard et al., Transplantation 49(2):251-257 (1990)) eller en løsning beskrevet i Stem et al., amerikansk patent nr. 5 552 267. I en annen utførelsesform er den organkonserverende sammensetningen hydroksyetylstivelse, laktobionsyre, raffinose eller en kombinasjon derav. I en annen utførelsesform omfatter sammensetningen for placentacelleinnsamling dessuten et oksygenbærende perfluorkarbon, enten i to faser eller som en emulsjon.

10

15

[0128] I en annen utførelsesform av fremgangsmåten settes placentaperfusatet og/eller placentaceller i kontakt med en sammensetning for placentacelleinnsamling omfattende en apoptoseinhibitor og et oksygenbærende perfluorkarbon, en organkonserverende forbindelse, eller en kombinasjon derav, under perfusjon. I en annen utførelsesform settes placentacellene i kontakt med sammensetningen for stamcelleinnsamling etter innsamling ved perfusjon.

20

[0129] Under innsamling, anrikelse og isolering av placentaceller begrenses eller elimineres cellebelastning på grunn av hypoksi og mekanisk belastning. I en annen utførelsesform av fremgangsmåten eksponeres derfor placentaperfusatet, en placentacelle eller en populasjon av placentaceller for en hypoksisk tilstand under innsamling, anrikelse eller isolering i mindre enn seks timer under konserveringen, der en hypoksisk tilstand er en konsentrasjon av oksygen som er mindre enn normal blodoksygenkonsentrasjon. I en mer spesifikk utførelsesform eksponeres populasjonen av placentaceller for den hypoksiske tilstanden i mindre enn to timer under konserveringen. I en annen mer spesifikk utførelsesform eksponeres populasjonen av placentaceller for den hypoksiske tilstanden i mindre enn én time, eller mindre enn tretti minutter, eller eksponeres ikke for en hypoksisk tilstand, under innsamling, anrikelse eller isolering. I en annen spesifikk utførelsesform eksponeres ikke populasjonen av placentaceller for skjærebeklastning under innsamling, anrikelse eller isolering.

25

30

35

[0130] Placentacellene som tilveiebringes heri kan kryokonserveres, *f.eks.* i kryokonserveringsmedium i små beholdere, *f.eks.* ampuller. Egnert kryopreserveringsmedium inkluderer, men er ikke begrenset til, kulturmedium, inkludert *f.eks.* vekstmedium, eller cellefrysingsmedium, *f.eks.* kommersielt tilgjengelig cellefrysingsmedium, *f.eks.* C2695, C2639 eller C6039 (Sigma). Kryokonserveringsmedium omfatter fortrinnsvis DMSO (dimetylsulfoksid) i en konsentrasjon på for eksempel ca. 10 % (volum/volum). Kryokonserveringsmedium kan omfatte ytterligere midler, *f.eks.* metylcellulose og/eller glyserol. Placentaceller kjøles fortrinnsvis ved ca. 1 °C/min under kryokonservering. En foretrukket kryokonserveringstemperatur er ca. 80 °C til ca. -180 °C, fortrinnsvis ca. -125 °C til ca. -140 °C. Kryokonserverte celler kan overføres til flytende nitrogen før tining for anvendelse. I noen utførelsesformer, *f.eks.* når ampullene har nådd ca. -90 °C, overføres de til et oppbevaringsområde med flytende nitrogen. Kryokonserverte celler tines fortrinnsvis ved en temperatur på ca. 25 °C til ca. 40 °C, fortrinnsvis en temperatur på ca. 37 °C.

5.7. Anvendelse av placentaperfusat, PINK-celler og kombinerte naturlige dreperceller fra placenta for å undertrykke tumorcellevekst

[0131] Heri tilveiebringes også fremgangsmåter for undertrykking av veksten, *f.eks.* proliferasjon av tumorceller ved anvendelse av placentaperfusat, celler isolert fra placentaperfusat, isolerte kombinerte naturlige dreperceller eller isolerte naturlige dreperceller fra placenta, *f.eks.* intermediære placentaderiverte naturlige dreperceller.

[0132] I en utførelsesform tilveiebringes det heri en fremgangsmåte for undertrykking av proliferasjonen av en tumorcelle, ellet mangfold av tumorceller, omfattende å sette tumorcellene eller mangfoldet av tumorceller i kontakt med placentaperfusatet, placentaperfusatceller, isolerte kombinerte naturlige dreperceller og/eller PINK-celler, slik at proliferasjonen av tumorcellen eller mangfoldet av tumorceller reduseres registrerbart sammenlignet med en tumorcelle eller et mangfold av tumorceller av samme type som har vært satt i kontakt med placentaperfusatet, perfusatceller, isolerte kombinerte naturlige dreperceller og/eller PINK-celler.

[0133] «Sette i kontakt med», som anvendt heri, innbefatter i en utførelsesform direkte fysisk, *f.eks.* celle-celle-kontakt mellom placentaperfusat,

placentaperfusatceller, naturlige dreperceller fra placenta, *f.eks.* intermediære placenta naturlige dreperceller og/eller isolerte kombinerte naturlige dreperceller; og en tumorcelle eller et mangfold av tumorceller. I en annen utførelsesform innbefatter «sette i kontakt med» forekomst i samme fysiske rom, *f.eks.* placentaperfusat, placentaperfusatceller, naturlige placenta dreperceller, *f.eks.* plasseres intermediære placenta naturlige dreperceller og/eller isolerte kombinerte naturlige dreperceller i samme beholder *f.eks.* dyrkingsskål, flerbrønnplate) som en tumorcelle eller mangfold av tumorceller. I en annen utførelsesform oppnås kontakt med placentaperfusat, placentaperfusatceller, kombinerte naturlige dreperceller eller intermediære naturlige dreperceller, og en tumorcelle eller mangfold av tumorceller, *f.eks.* ved injeksjon eller infusjon av placentaperfusatet eller cellene, *f.eks.* placentaperfusatceller, kombinerte naturlige dreperceller eller intermediære naturlige dreperceller fra placenta inn i et individ, *f.eks.* et menneske, omfattende en tumorcelle eller mangfold av tumorceller, *f.eks.* en kreftpasient.

[0134] I visse utførelsesformer anvendes placentaperfusat i enhver mengde som resulterer i en registrerbar terapeutisk fordel for et individ omfattende en tumorcelle eller mangfold av tumorceller, *f.eks.* en kreftpasient. I visse utførelsesformer anvendes placentaperfusatceller, intermediære naturlige dreperceller og/eller kombinerte naturlige dreperceller i enhver mengde som resulterer i en registrerbar terapeutisk fordel for et individ omfattende en tumorceller eller mangfold av tumorceller. I en annen utførelsesform tilveiebringes heri en fremgangsmåte for undertrykking av proliferasjon av en tumorcelle, eller mangfold av tumorceller, omfattende å sette tumorcellen eller mangfoldet av tumorceller i kontakt med placentaperfusat, placentaperfusatceller og/eller intermediære naturlige dreperceller, eller mangfold av PINK-celler, i et individ slik at kontakten er registrerbart eller demonstrerbart fordelaktig for individet.

[0135] «Terapeutiske fordeler», som anvendt heri, inkluderer men er ikke begrenset til, *f.eks.* reduksjon i størrelsen av en tumor; reduksjon eller opphør av en tumors ekspansjon; reduksjon i antallet kreftceller i en vevsprøve, *f.eks.* en blodprøve, pr. enhet volum; klinisk forbedring i et hvilket som helst symptom på den bestemte kreften hos individet, reduksjon eller opphør av forverring av et hvilket som helst symptom på den bestemte kreften hos individet osv. Opprettelse av kontakt mellom perfusat, placentaperfusatceller og/eller PINK-celler som oppnår én eller flere slike terapeutiske fordeler sies å være terapeutisk fordelaktig.

[0136] I visse utførelsesformer anvendes placentaperfusatceller, *f.eks.* nukleerte celler fra placentaperfusat, kombinerte naturlige dreperceller og/eller intermediære naturlige dreperceller fra placenta i enhver mengde eller antall som resulterer i en registrerbar terapeutisk fordel til et individ omfattende en tumorceller eller mangfold av tumorceller, *f.eks.* en kreftpasient. Placentaperfusatceller, kombinerte naturlige dreperceller og/eller naturlige placenta dreperceller, *f.eks.* intermediære naturlige dreperceller kan administreres til et slikt individ etter antall celler, *f.eks.* kan individet administreres ved omtrent, minst omtrent eller i det meste omtrent 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} eller 5×10^{10} placentaperfusatceller, kombinerte naturlige dreperceller og/eller naturlige dreperceller. I andre utførelseformer kan placentaperfusatceller, kombinerte naturlige dreperceller og/eller placentaderiverte intermediære naturlig dreperceller administreres til et slikt individ etter antall celler, *f.eks.* kan individet administreres ved omtrent, minst omtrent eller i det meste omtrent 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} eller 5×10^{10} placentaperfusatceller, kombinerte naturlige dreperceller og/eller naturlige dreperceller pr. kilogram av individet. Placentaperfusatceller og/eller placentaderiverte intermediære naturlige dreperceller kan administreres til et slikt individ ifølge et omtrentlig forhold mellom placentaperfusatceller og/eller naturlige dreperceller fra placenta, *f.eks.* intermediære naturlige dreperceller og tumorceller i individet. Placentaperfusatceller og/eller naturlige placenta dreperceller, *f.eks.* intermediære naturlige dreperceller fra placenta kan *f.eks.* administreres til individet i et forhold på omtrent, minst omtrent eller for det meste 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 eller 100:1 til antall tumorceller hos individet. Antallet tumorceller hos et slikt individ kan estimeres, *f.eks.* ved opptelling av antall tumorceller i en prøve av vev fra individet, *f.eks.* blodprøve, biopsi eller lignende. I en spesifikk utførelsesform, *f.eks.* for solide tumorer, gjennomføres slik opptelling i kombinasjon med avbildning av tumoren eller tumorene for å fastsette et omtrent tumorvolum.

[0137] Videre tilveiebringes heri en fremgangsmåte for undertrykking av proliferasjonen av en tumorcelle eller mangfold av tumorceller ved anvendelse av kombinasjoner av placentaperfusat, placentaperfusatceller, kombinerte naturlige dreperceller og/eller placentaderiverte intermediære naturlige dreperceller. I

forskjellige utførelsesformer tilveiebringes det heri en fremgangsmåte for undertrykking av proliferasjonen av en tumorcelle eller et mangfold av tumorceller omfattende å sette tumorcellen eller tumorcellene i kontakt med placentaperfusat supplert med et mangfold av placentaperfusatceller eller PINK-celler; PINK-celler supplert med placentaperfusat og placentaperfusatceller, et mangfold av PINK-celler og et mangfold av kombinerte naturlige dreperceller; et mangfold av kombinerte naturlige dreperceller og et mangfold av placentaperfusatceller; placentaperfusat supplert med kombinerte naturlige dreperceller; eller en kombinasjon av alle av placentaperfusat, placentaperfusatceller, kombinerte naturlige dreperceller og PINK-celler.

[0138] I én spesifikk utførelsesform undertrykkes f.eks. proliferasjonen av tumorceller eller mangfoldet av tumorceller av placentaperfusat supplert med et mangfold av placentaperfusatceller, kombinerte naturlige dreperceller og/eller et mangfold av intermediære naturlige dreperceller fra placenta. I spesifikke utførelsesformer vil f.eks. hver millimeter placentaperfusat suppleres med omtrent 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 eller mer placentaperfusatceller eller intermediære naturlige dreperceller fra placenta. I andre spesifikke utførelsesformer suppleres placentaperfusat f.eks. én enhet (dvs. samlet inn fra en enkelt placenta) eller omtrent 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 eller 100 ml perfusat med omtrent 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 eller mer PINK-celler, kombinerte naturlige dreperceller og/eller placentaperfusatceller pr. millimeter eller 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} eller flere PINK-celler, kombinerte naturlige dreperceller og/eller placentaperfusatceller.

[0139] I en annen spesifikk utførelsesform undertrykkes proliferasjonen av en tumorcelle eller et mangfold av tumorceller av et mangfold av placentaperfusatceller supplert med placentaperfusat, kombinerte naturlige dreperceller og/eller intermediære naturlige dreperceller fra placenta. I mer spesifikke utførelseformer suppleres 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 eller mer placentaperfusatceller pr. milliliter eller 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} eller mer placentaperfusatceller med omtrent, eller minst omtrent 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 eller mer PINK-

celler og/eller kombinerte naturlige dreperceller pr. milliliter eller 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^1 , 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} eller mer PINK-celler. I andre mer spesifikke utførelsesformer suppleres omtrent 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 eller mer placentaperfusatceller, PINK-celler og/eller kombinerte naturlige dreperceller pr. milliliter eller 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} eller mer placentaperfusatceller med omtrent, eller minst omtrent 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 eller 100 ml perfusat, eller omtrent 1 enhet perfusat.

[0140] I en annen spesifikk utførelsesform undertrykkes proliferasjonen av en tumorcelle eller et mangfold av tumorceller av et mangfold av intermedieære naturlige dreperceller supplert med placentaperfusat, og/eller kombinerte naturlige dreperceller. I mer spesifikke utførelseformer suppleres 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^1 , 5×10^1 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 eller mer intermedieære naturlige dreperceller pr. milliliter eller 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} eller mer PINK-celler med omtrent, eller minst omtrent 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 eller mer placentaperfusatceller og/eller kombinerte naturlige dreperceller pr. milliliter eller 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} eller mer placentaperfusatceller og/eller kombinerte naturlige dreperceller. I andre mer spesifikke utførelsesformer suppleres omtrent 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 eller mer placentaperfusatceller og/eller kombinerte naturlige dreperceller pr. milliliter eller 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} eller mer intermedieære naturlige dreperceller fra placenta og/eller kombinerte naturlige dreperceller med omtrent, eller minst omtrent 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 eller 100 ml perfusat, eller omtrent 1 enhet perfusat.

[0141] I en annen utførelsesform undertrykkes proliferasjonen av en tumorcelle eller et mangfold av tumorceller ved å sette tumorcellen eller tumorcellene i kontakt med placentaperfusat, perfusatceller, PINK-celler og/eller kombinerte naturlige dreperceller supplert med vedheftede stamceller. I spesifikke utførelsesformer suppleres placentaperfusatet, perfusatceller eller PINK-celler med omtrent 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 eller flere celler pr. milliliter eller 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} eller flere vedheftende placentastamceller.

[0142] I en annen utførelsesform undertrykkes proliferasjonen av en tumorcelle eller et mangfold av tumorceller ved å sette tumorcellen eller tumorcellene i kontakt med placentaperfusat, perfusatceller, kombinerte naturlige dreperceller og/eller PINK-celler supplert med vedheftede placentastamcellekondisjonert medium *f.eks.* 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 av stamcellekondisjonert dyrkingsmedium pr. enhet perfusat, perfusatceller, kombinerte naturlige dreperceller og/eller PINK-celler eller pr. 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 eller 10^{10} celler.

[0143] I andre utførelsesformer anvendes placentaperfusatet, placentaperfusatceller, naturlige dreperceller fra placenta, *f.eks.* PINK-celler, kombinerte naturlige dreperceller og kombinasjoner og sammenslåinger omfattende samme som oppnådd innledningsvis, dvs. perfusatet som oppnådd under perfusjon, perfusatceller som isolert fra slikt perfusat, kombinerte naturlige dreperceller fra slikt perfusat og matchet navlestrengblod, eller PINK-celler isolert fra slikt perfusat eller slike placentaperfusatceller. I andre utførelsesformer behandles placentaperfusatet, placentaperfusatcellene, PINK-celler og kombinasjoner og sammenslåinger av samme før anvendelse. Placentaperfusat kan *f.eks.* anvendes i rå, ubehandlet form som samlet inn fra placenta. Placentaperfusat kan også behandles før anvendelse, *f.eks.* ved negativt valg av én eller flere celletyper, volumreduksjon ved dehydrering; frysetørking og rehydrering osv. Populasjoner av perfusatceller kan på lignende måte anvendes som isolert innledningsvis fra placentaperfusat, *f.eks.* som fullstendig nukleerte celler fra placentaperfusat eller kan behandles for *f.eks.* å fjerne én eller flere celletyper (*f.eks.* erytrocytter). PINK-celler kan anvendes som isolert innledningsvis fra placentaperfusat, *f.eks.* ved anvendelse av CD56-mikrokuler eller kan behandles for *f.eks.* å fjerne én eller flere ikke-drepercelletyper.

[0144] I en annen utførelsesform tilveiebringes det heri en fremgangsmåte for undertrykking av proliferasjonen av en tumorcelle eller tumorceller, omfattende å sette tumorcellen eller tumorcellene i kontakt med placentaperfusat, placentaperfusatceller, PINK-celler, kombinerte naturlige dreperceller eller sammenslåinger eller kombinasjoner omfattende samme, hvor placentaperfusatet, placentaperfusatcellene, PINK-cellene, de kombinerte naturlige drepercellene eller sammenslåinger eller kombinasjoner omfattende samme har vært satt i kontakt med interleukin-2 (IL-2) i et tidsrom før oppretting av kontakten. I visse utførelsesformer er tidsperioden omtrent, minst eller på det meste 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 eller 48 før opprettingen av kontakt.

[0145] Perfusatet, perfusatceller, PINK-celler, kombinerte naturlige dreperceller eller sammenslåinger og/eller kombinasjoner av samme kan administreres én gang til et individ med kreft, eller et individ med tumorceller i løpet av antikreftbehandling eller kan administreres flere ganger, *f.eks.* én gang hver 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 eller 23 timer, eller én gang hver 1, 2, 3, 4, 5, 6 eller 7 dager, eller én gang hver 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 eller flere uker i løpet av behandling. Perfusatet, perfusatceller, PINK-celler, sammenslåinger og/eller kombinasjoner av de samme kan administreres uten hensyn til om perfusatet, perfusatcellene, PINK-cellene, sammenslåingene og/eller kombinasjonene av samme har vært administrert tidligere til en person med kreft, eller som har tumorceller. Fremgangsmåtene som tilveiebringes heri innbefatter således administreringen til en person som har kreft eller som har tumorceller av en hvilken som helst kombinasjon av placentaperfusat, perfusatceller, PINK-celler, sammenslåinger og/eller kombinasjoner omfattende de samme.

[0146] I en spesifikk utførelseform er tumorcellene blodkreftceller. I forskjellige spesifikke utførelsesformer er tumorcellene primære duktalt karsinom-celler, leukemiceller, akutt T-celleleukemiceller, kronisk myeloid lymfom (CML)-celler, akutt myelogen leukemiceller, kronisk myelogen leukemi (CML)-celler, lungekreftceller, kolonadenokarsinomceller, histiocytt-lymfomceller, myelomatosecelle, retinoblastomceller, kolorektalt karsinom-celler eller kolorektalt adenokarsinom-celler.

[0147] Placentaperfusatet, perfusatcellene, PINK-cellene, de kombinerte naturlige drepercellene og/eller kombinasjoner omfattende de samme kan være del av et antikreftterapiregime som inkluderer ett eller flere andre antikreftmidler. Slike antikreftmidler er velkjente i faget. Spesifikke antikreftmidler som kan administreres

5 til et individ med kreft, i tillegg til perfusatet, perfusatceller, PINK-celler, sammenslåinger og/eller kombinasjoner av de samme, inkluderer, men er ikke begrenset til: acivicin; akclarubicin; akodazolhydroklorid; akronin; adozelesin; aldesleukin; altretamin; ambomycin; ametantron acetat; amsakrin; anastrozol; antramycin; asparaginase; asperlin; azacitidin; azetepa; azotomycin; batimastat;

10 benzodepa; bicalutamid; bisantrenhydroklorid; bisnafiddimesylat; bizelesin; bleomycinsulfat; brequinarnatrium; bropirimin; busulfan; kaktinomycin; kalusteron; karacemid; karbetimer; karboplatin; karmustin; karubicinhydroklorid; karzelesin; cedefingol; celekoksib (COX-2-inhibitor); klorambucil; kirolemycin; sisplatin; kladribin; krisnatolmesylat; syklofosfamid; cytarabin; dakarbazin; daktinomycin;

15 daunorubicinhydroklorid; decitabin; deksormaplatin; dezaguanin; dezaguaninmesylat; diaziquon; docetaxsel; doksorubicin; doksorubicinhydroklorid; droloksifen; droloksifencitrat; dromostanolonpropionat; duazomycin; edatreksat; eflomitinhydroklorid; elsamitrucin; enloplatin; enpromat; epipropidin; epirubicinhydroklorid; erbulozol; esorubicinhydroklorid; estramustin;

20 estramustinfosfatnatrium; etanidazol; etoposid; etoposidfosfat; etoprin; fadrozolhydroklorid; fazarabin; fenretinid; floksuridin; fludarabinfosfat; fluorouracil; flurocitabin; fosquidon; fostriecinnatrium; gemcitabin; gemcitabinhydroklorid; hydroksyurea; idarubicinhydroklorid; ifosfamid; ilmofosin; iproplatin; irinotecan; irinotecanhydroklorid; lanreotidacetat; letrozole; leuprolidacetat; liarozolhydroklorid;

25 lometreksolnatrium; lomustin; losoksantronhydroklorid; masoprocol; maytansin; mekloreタミンhydroklorid; megestrolacetat; melengestrolacetat; melfalan; menogaril; mercaptopurin; metotreksat; metotreksatnatrium; metoprin; meturedpa; mitindomid; mitocarcin; mitocromin; mitogillin; mitomalcin; mitomycin; mitosper; mitotan; mitoksantronhydroklorid; mycofenolsyre; nocodazol;

30 nogalamycin; ormaplatin; oksisuran; paclitaxsel; pegaspargas; peliomycin; pentamustin; peplomycinsulfat; perfosfamid; pipobroman; piposulfan; piroksantronhydroklorid; plicamycin; plomestan; porfimernatrium; porfiromycin; prednimustin; procarbazinehydroklorid; puromycin; puromycinhydroklorid; pyrazofurin; riboprin; safingol; safingolhydroklorid; semustin; simtrazen;

35 sparfosatnatrium; sparsomycin; spirogermaniumhydroklorid; spiromustin; spiroplatin; streptonigrin; streptozocin; sulofenur; talisomycin; tecogalannatrium; taksotere; tegafur; teloksantronhydroklorid; temoporfin; teniposid; teroksiron;

testolacton; tiamiprin; tioguanin; tiotepa; tiazofurin; tirapazamin; toremifencitrat; trestolonacetat; triceribinfosfat; trimetreksat; trimetreksatglukuronat; triptorelin; tubulozolhydroklorid; uracilsennep; uredepa; vapreotid; verteporfin; vinblastinsulfat; vincristinsulfat; vindesin; vindesinsulfat; vinepidinsulfat; vinglycinatsulfat; vinleurosinsulfat; vinorelbintartrat; vinrosidinsulfat; vinzolidinsulfat; vorozole; zeniplatin; zinostatin; og zorubicinhydroklorid.

[0148] Andre antikreftlegemidler inkluderer, men er ikke begrenset til: 20-epi-1,25 dihydroksyvitamin D3; 5-etynyluracil; abirateron; aklarubicin; acylfulven; adecypenol; adozelesin; aldesleukin; ALL-TK-antagonister; altretamin; ambamustin; amidoks; amifostin; aminolevulinsyre; amrubicin; amsakrin; anagrelid; anastrozol; andrografolid; angiogeneseinhibitorer; antagonist D; antagonist G; antarelix; anti-dorsaliserende morfogenetisk protein-1; antiandrogen, prostatakarsinom; antiestrogen; antineoplaston; antisensoligonukleotider; afidikolinglysinat; apoptosegenmodulatorer; apoptoseregulatorer; apurinsyre; ara-CDP-DL-PTBA; arginindeaminase; asulakrin; atamestan; atrimustin; aksinastatin 1; aksinastatin 2; aksinastatin 3; azasetron; azatoksin; azatyrosin; baccatin III-derivater; balanol; batimastat; BCR/ABL-antagonister; benzokloriner; beadozelesinnzoylstauosporin; betalaktamderivater; beta-aletin; betaklamysin B; betulinsyre; bFGF-inhibitor; bikalutamid; bisantren; bisaziridinylspermin; bisnafid; bistraten A; bizelesin; breflat; bropirimin; budotitan; butioninsulfoksimin; kalsipotriol; kalfostin C; kamptotesinderivater; kapecitabin; karboksamid-amino-triazol; karboksyamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; bruskavledet inhibitor; karzelesin; kaseinkinaseinhibitorer (ICOS); kastanospermin; sekropin B; setroreliker; kloriner; klorkinoksalinsulfonamid; sikaprost; cis-porfyrin; kladribin; klomifenanaloger; klotrimazol; kollismycin A; kollismycin B; kombretastatin A4; kombretastatinanalog; konagenin; krambescidin 816; krisnatol; kryptofycin 8; kryptofycin A-derivater; kuracin A; syklopentantrakinoner; sykloplatam; cypemycin; cytarabinosfosfat; cytolytisk faktor; cytostatin; dakliksimab; decitabin; dehydrodidemnin B; deslorelin; deksametason; deksifosfamid; deksrazoksan; deksverapamil; diazikvon; didemnin B; didoks; dietylnorspermin; dihydro-5-azacytidin; 9-dihydrotaksol; dioksamycin; difenylspiromustin; docetaxel; dokosanol; dolasetron; doksifluridin; droloksifen; dronabinol; duokarmycin SA; ebselen; ekomustin; edelfosin; edrekolomab; eflornitin; elemen; emitefur; epirubicin; epristerid; estramustinanalog; østrogenagonister; østrogenantagonister; etanidazol; etoposidfosfat; eksemestan; fadrozol;

fazarabin; fenretinid; filgrastim; finasterid; flavopiridol; flezelastin; fluasteron;
 fludarabin; fluordaunorunicinhydroklorid; forfenimex; formestan; fostriecin;
 fotemustin; gadoliniumteksafyrin; galliumnitrat; galocitabin; ganirelix;
 gelatinaseinhibitorer; gemcitabin; glutasjonsinhibitorer; hepsulfam; heregulin;
 5 heksametylenbisaketamid; hypericin; ibandronsyre; idarubicin; idoksifen;
 idramanton; ilmofofin; ilomastat; imatinib (*f.eks.* GLEEVEC®) imikimod;
 immunstimulantpeptider; insulinlignende vekstfaktor-1-reseptorinhibitor;
 interferonagonister; interferoner; interleukiner; iobenguan; joddoksorubicin; 4-
 ipomeanol; iroplakt; irsogladin; isobengazol; isohomohalikondrin B; itasetron;
 10 jasplakinolid; kahalalid F; lamellarin-N triacetat; lanreotid; leinamycin;
 lenograstim; lentinansulfat; leptolstatin; letrozol; leukemiinhiberende faktor;
 leukocyt alfa-interferon; leuprolid+østrogen+progesteron; leuprorelin;
 levamisol; liarozol; lineær polyaminanalog; lipofilt disakkaridpeptid; lipofile
 platinaforbindelser; lissoklinamid 7; lobaplatin; lombricin; lometreksol;
 15 lonidamin; losoksantron; loksoribin; lurtotekan; lutetiumteksafyrin; lysofyllin;
 lytiske peptider; maitansin; mannostatin A; marimastat; masoprokol; maspin;
 matrilysininhitorer; matrisemetalloproteinaseinhibitorer; menogaril; merbaron;
 meterelin; metioninase; metoklopramid; MIF-inhibitor; mifepriston; miltefosin;
 mirimostim; mitoguazon; mitolaktol; mitomycinanaloger; mitonafid;
 20 mitotoksinfibroblastvekstfaktor-saporin; mitoksantron; mofaroten;
 molgramostim; monoklonalt antistoff, humant choriongonadotrofin; monofosforyl
 lipid A+myobakteriecellevegg sk; mopidamol; sennepanticancermiddel;
 mykaperoksid B; mykobakteriecelleveggeksrakt; myriaporon; N-acetyldinalin;
 N-substituerte benzamider; nafarelin; nagrestip; nalokson+pentazocin; napavin;
 25 nafterpin; nartograstim; nedaplatin; nemorubicin; neridronsyre; nilutamid;
 nisamycin; nitrogenmonoksidmodulatorer; nitroksidantioksidant; nitrullyn;
 oblimersen (GLEEVEC®); O⁶-benzylguanin; oktreotid; okicenon;
 oligonukleotider; onapriston; ondansetron; ondansetron; oracin; oral
 cytokininduser; ormaplatin; osateron; oksaliplatin; oksaunomycin; paklitaksel;
 30 paklitakselanaloger; paklitakselderivater; palauamin; palmitoylrizoksin;
 pamidronsyre; panaksytriol; panomifen; parabactin; pazelliptin; pegaspargase;
 peldesin; pentosanpolysulfatnatrium; pentostatin; pentrozol; perflubron;
 perfosfamid; perillylalkohol; fenazinomycin; fenylacetat; fosfataseinhibitorer;
 picibanil; pilokarpinhydroklorid; pirarubicin; piritreksim; placetin A; placetin B;
 35 plasminogenaktivatorinhibitor; platinakompleks; platinaforbindelser; platina-
 triaminkompleks; porfimernatrium; porfiromycin; prednison; propylbis-akridon;
 prostaglandin J2; proteasominhibitorer; protein A-basert immunmodulator;

proteinkinase C-inhibitor; proteinkinase C-inhibitorer, mikroalgal;
 proteintyrosinfosfataseinhibitorer; purinnukleosidfosforylaseinhibitorer;
 purpuriner; pyrazoloakridin; pyridoksyliert hemoglobinpolyoksyetylenkonjugat;
 rafantagonister; raltitreksed; ramosetron;
 5 rasfarnesylproteintransferaseinhibitorer; rasinhibitorer; ras-GAP-inhibitor;
 retelliptindemetylated; rhenium Re 186-etidronat; rizoksin; ribozymmer; RII-
 retinamid; roitukin; romurtid; roquinimeks; rubiginon B1; ruboksyl; safingol;
 saintopin; SarCNU; sarkofytol A; sargramostim; Sdi I-mimetikk; semustin;
 senescensavledet inhibitor 1; sensoligonukleotider;
 10 signaltransduksjoninhibitorer; sizofran; sobuzoksan; natriumborkaptat;
 natriumfenylacetat; solverol; somatomedinbindingsprotein; sonermin;
 sparfosinsyre; spicamycin D; spiromustin; splenopentin; spongistatin 1;
 skvalamin; stipiamid; stromelysininhibitorer; sulfinosin; superaktiv vasoaktiv
 tarmpeptidantagonist; suradista; suramin; swainsonin; tallimustin;
 15 tamoksifenmetiodid; tauromustin; tazaroten; tekogalannatrium; tegafur;
 tellurapyrylium; telomeraseinhibitorer; temoporfin; teniposid;
 tetraklordekaoksid; tetrazomin; taliblastin; tiokoralin; trombopoietin;
 trombopoietinmimetikum; tymalfasin; tymopoietinreseptoragonist; tymotrinan;
 skjoldbruskkjertelstimulerende hormon; tinnetyletiopurpurin; tirapazamin;
 20 titanocenbiklorid; topsentin; toremifen; translasjonsinhibitorer; tretinoin;
 triacetyluridin; triciribin; trimetreksat; triptorelin; tropisetron; turosterid;
 tyrosinkinaseinhibitorer; tyrfostiner; UBC-inhibitorer; ubenimex; urogenital
 sinusavledet vekstinhiberende faktor; urokinasereseptorantagonister; vapreotid;
 variolin B; velaresol; veramin; verdiner; verteporfin; vinorelbin; vinksaltin;
 25 vitaksin; vorozol; zanoteron; zeniplatin; zilaskorb; og zinostatinstimalamer.

5.8. Behandling av naturlige dreperceller med immunmodulerende forbindelser

30 **[0149]** Isolerte naturlige dreperceller, *f.eks.* PINK-celler eller kombinerte naturlige
 dreperceller, som beskrevet andre steder heri, kan behandles med en
 immunmodulerende forbindelse, *f.eks.* settes i kontakt med en immunmodulerende
 forbindelse, for å forsterke cellens antitumoraktivitet. Heri tilveiebringes således en
 fremgangsmåte for å øke cytotoxisiteten for en naturlig drepercelle mot en
 35 tumorcelle omfattende å sette den naturlige drepercellen i kontakt med en
 immunmodulerende forbindelse i et tidsrom og i en konsentrasjon som er
 tilstrekkelig for å la den naturlige drepercellen vise økt cytotoxisitet mot en

tumorcelle sammenlignet med en naturlig drepercelle som ikke har vært i kontakt med den immunmodulerende forbindelsen. I en annen utførelsesform tilveiebringes det heri en fremgangsmåte for å øke granzym B i en naturlig drepercelle omfattende å sette den naturlige drepercellen i kontakt med en immunmodulerende forbindelse i et tidsrom og i en konsentrasjon som er tilstrekkelig for den naturlige drepercellen å vise økt ekspresjon av granzym B sammenlignet med en naturlig drepercelle som ikke har vært i kontakt med den immunmodulerende forbindelsen. Den immunmodulerende forbindelsen kan være en hvilken som helst forbindelse beskrevet nedenfor, *f.eks.* lenalidomid eller pomalidomid.

[0150] Heri tilveiebringes også en fremgangsmåte for økning av cytotoksiteteten til en populasjon av naturlige dreperceller, *f.eks.* PINK-celler eller kombinerte naturlige dreperceller, mot et mangfold av tumorceller omfattende å sette populasjonen av naturlige dreperceller i kontakt med en immunmodulerende forbindelse i et tidsrom og i en konsentrasjon tilstrekkelig for populasjonen av naturlige dreperceller å vise registrerbar økt cytotoksitetet mot mangfoldet av tumorceller sammenlignet med et ekvivalent antall naturlige dreperceller som ikke har vært i kontakt med den immunmodulerende forbindelsen. I en annen utførelsesform tilveiebringes det heri en fremgangsmåte for økning av ekspresjonen av granzym B i en populasjon av naturlige dreperceller omfattende å sette populasjonen av naturlige dreperceller i kontakt med en immunmodulerende forbindelse i et tidsrom og i en konsentrasjon tilstrekkelig til at populasjonen av naturlige dreperceller uttrykker registrerbart høyere mengder av granzym B sammenlignet med et ekvivalent antall dreperceller som ikke har vært i kontakt med den immunmodulerende forbindelsen. I en spesifikk utførelsesform inneholdes populasjonen av naturlige dreperceller inni placentaperfusatceller, *f.eks.* fullstendig nukleerte celler fra placentaperfusat.

[0151] I spesifikke utførelsesformer av de ovennevnte utførelsesformene er de naturlige drepercellene CD56⁺, CD16⁻ intermediære naturlige dreperceller fra placenta (PINK-celler). I en annen spesifikk utførelsesform av de ovennevnte utførelsesformene er de naturlige drepercellene kombinerte naturlige dreperceller, *dvs.* naturlige dreperceller fra matchet placentaperfusat og navlestrengblod.

[0152] I en annen spesifikk utførelsesform settes mangfoldet av naturlige dreperceller, *f.eks.* PINK-celler eller kombinerte naturlige dreperceller i kontakt med den immunmodulerende forbindelse som uttrykker ett eller flere av BAX, CCL5, CCR5, CSF2, FAS, GUSB, IL2RA eller TNFRSF18 ved et høyere nivå enn

et ekvivalent antall av de naturlige drepercellene som ikke er i kontakt med den immunmodulerende forbindelsen. I en annen spesifikk utførelsesform settes mangfoldet av naturlige dreperceller, f.eks. PINK-celler i kontakt med den immunmodulerende forbindelsen som uttrykker ett eller flere av ACTB, BAX, CCL2, CCL3, CCL5, CCR5, CSF1, CSF2, ECE1, FAS, GNLY, GUSB, GZMB, IL1A, IL2RA, IL8, IL10, LTA, PRF1, PTGS2, SKI og TBX21 ved et høyere nivå enn et ekvivalent antall av de naturlige drepercellene som ikke er satt i kontakt med den immunmodulerende forbindelsen.

[0153] Heri tilveiebringes også en fremgangsmåte for økning av cytotoxiskiteten for en populasjon av humane placentaperfusatceller, f.eks. fullstendig nukleerte celler fra placentaperfusat, mot et mangfold av tumorceller, omfattende å sette placentaperfusatcellene i kontakt med en immunmodulerende forbindelse i et tidsrom og i en konsentrasjon tilstrekkelig for placentaperfusatcellene å vise registrerbar økt cytotoxiskitet mot mangfoldet av tumorceller sammenlignet med et ekvivalent antall placentaperfusatceller som ikke har vært i kontakt med den immunmodulerende forbindelsen. I en annen utførelsesform tilveiebringes det heri en fremgangsmåte for økning av ekspresjonen av granzym B i en populasjon av placentaperfusatceller omfattende å sette populasjonen av placentaperfusatceller i kontakt med en immunmodulerende forbindelse i et tidsrom og i en konsentrasjon tilstrekkelig til at populasjonen av placentaperfusatceller uttrykker registrerbart høyere mengder av granzym B sammenlignet med et ekvivalent antall placentaperfusatceller som ikke har vært i kontakt med den immunmodulerende forbindelsen.

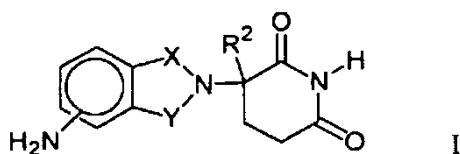
[0154] Immunmodulerende forbindelser kan enten anskaffes kommersielt eller fremstilles ifølge fremgangsmåtene beskrevet i patentene eller patentpublikasjonene henvist til heri. Optisk rene sammensetninger kan syntetiseres asymmetrisk eller løses opp ved kjente oppløsningsmidler eller kiralkolonner, samt andre standardteknikker i organisk kjemi. Immunmodulerende forbindelser kan være racemiske, stereoisomeriske berikede eller stereoisomerisk rene, og kan innbefatte farmasøytisk akseptable salter, løsninger og prolegemidler derav.

[0155] Uttrykket «immunmodulerende forbindelser», som anvendt heri og med mindre annet er angitt, innbefatter små organiske molekyler som tydelig inhiberer TNF- α , LPS-indusert monocyt IL-1 β IL-12 og delvis inhiberer IL-6 p I

spesifikke eksempler er de immunmodulerende forbindelsene lenalidomid, pomalidomid eller talidomid.

[0156] Spesifikke eksempler på immunmodulerende forbindelser inkluderer, men er ikke begrenset til cyano- og karboksyderivater av substituerte styrener, slik som dem offentliggjort i amerikansk patent nr. 5,929,117; 1-okso-2-(2,6-diokso-3-fluoropiperidin-3-yl)-isoindoliner og 1,3-diokso-2-(2,6-diokso-3-fluoropiperidin-3-yl)-isoindoliner, slik som dem beskrevet i amerikansk patent nr. 5,874,448 og 5,955,476; de tetra-substituerte 2-(2,6-dioksopiperidin-3-yl)-1-oksoisoindolinene beskrevet i amerikansk patent nr. 5,798,368; 1-okso og 1,3-diokso-2-(2,6-dioksopiperidin-3-yl)-isoindoliners (*f.eks.* 4-metylderivater av talidomid), inkludert, men ikke begrenset til de offentliggjort i amerikansk patent nr. 5,635,517, 6,476,052, 6,555,554 og 6,403,613; 1-okso og 1,3-dioksoisoindoliner substituert i 4- eller 5-posisjon av indolinringen (*f.eks.*, 4-(4-amino-1,3-dioksoisoindolin-2-yl)-4-karbamoylbutanoinnsyre) beskrevet i amerikansk patent nr. 6,380,239; isoindolin-1-on og isoindolin-1,3-dionsubstituert i 2-posisjonen med 2,6-diokso-3-hydroksypiperidin-5-yl (*f.eks.*, 2-(2,6-diokso-3-hydroksy-5-fluoropiperidin-5-yl)-4-aminoisoindolin-1-on) beskrevet i amerikansk patent nr. 6,458,810; en klasse ikke-polypeptid sykliske amider offentliggjort i amerikansk patent nr. 5,698,579 og 5,877,200; aminotalidomid, samt som analoger, hydrolyseprodukter, metabolitter, derivater og prekursorer for aminotalidomid og substituert 2-(2,6-dioksopiperidin-3-yl)-ftalimider og substituert 2-(2,6-dioksopiperidin-3-yl)-1-oksoisoindoler, slik som dem beskrevet i amerikansk patent nr. 6,281,230 og 6,316,471; og isoindoleimid-forbindelser, slik som dem beskrevet i amerikansk patentpublikasjon nr. 2003/0045552 A1, amerikansk patent nr. 7,091,353 og WO 02/059106. Immunmodulerende forbindelser inkluderer ikke talidomid.

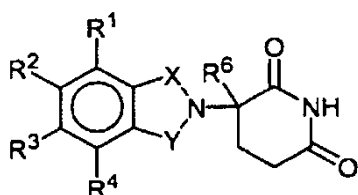
[0157] I bestemte utførelsesformer er de immunmodulerende forbindelsene 1-okso- og 1,3 diokso-2-(2,6-dioksopiperidin-3-yl)-isoindoliner substituert med amino i benzoringen som beskrevet i amerikansk patent nr. 5,635,517. Disse forbindelsene har struktur I:



der én av X og Y er C=O, den andre av X og Y er C=O eller CH₂ og R² er hydrogen eller lavere alkyl, særlig metyl. Spesifikke immunmodulerende forbindelser inkluderer, men er ikke begrenset til:

- 5 1-okso-2-(2,6-dioksopiperidin-3-yl)-4-aminoisoindolin;
 1-okso-2-(2,6-dioksopiperidin-3-yl)-5-aminoisoindolin;
 1-okso-2-(2,6-dioksopiperidin-3-yl)-6-aminoisoindolin;
 1-okso-2-(2,6-dioksopiperidin-3-yl)-7-aminoisoindolin;
 1,3-dio-2-(2,6-dioksopiperidin-3-yl)-4-aminoisoindolin; og
 10 1,3-dio-2-(2,6-dioksopiperidin-3-yl)-5-aminoisoindolin.

[0158] Andre spesifikke immunmodulerende forbindelser tilhører en klasse substituerte 2-(2,6-dioksopiperidin-3-yl)-ftalamider og substituerte 2-(2,6-dioksopiperidin-3-yl)-1-oksoisoindoler, slik som dem beskrevet i amerikansk
 15 patent nr. 6,281,230; 6,316,471; 6,335,349; og 6,476,052 og WO 98/03502. Representative forbindelser er av formel:



20 der:

én av X og Y er C=O og den andre av X og Y er C=O eller CH₂;

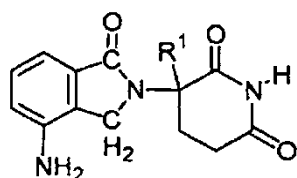
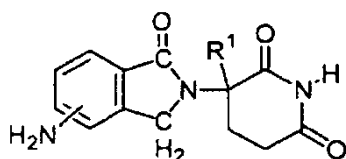
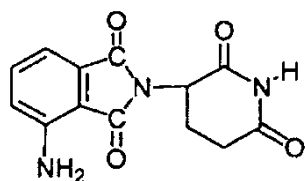
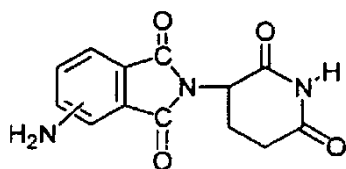
- (i) hver av R¹, R², R³ eller R⁴, uavhengig av de andre, er halo, alkyl med 1 til 4 karbonatomer, eller alkoksy med 1 til 4 karbonatomer eller (ii) én av R¹, R², R³ og R⁴ er -NHR⁵ og resten av R¹, R², R³ og R⁴ er hydrogen;

25 R⁵ er hydrogen eller alkyl med 1 til 8 karbonatomer;

R⁶ er hydrogen eller alkyl med 1 til 8 karbonatomer, benzyl eller halo;

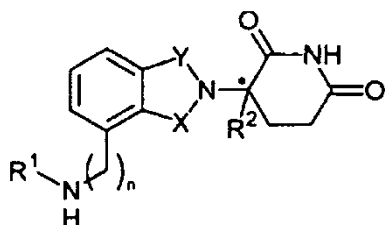
forutsatt at R⁶ er annet enn hydrogen hvis X og Y er C=O og (i) hver av R¹, R², R³ og R⁴ er fluoro eller (ii) én av R¹, R², R³ eller R⁴ er amino.

30 **[0159]** Forbindelser representative for denne klassen er av formlene:



der R^1 er hydrogen eller metyl. I en separat utførelsesform innbefattes
anvendelsen av enantiomer rene former (*f.eks.* optisk rene (R) eller (S)
enantiomerer) av disse forbindelsene.

[0160] Andre spesifikke immunmodulerende forbindelser tilhører imidlertid en
klasse isoindol-imider offentliggjort i amerikansk patentsøknadpublikasjon nr.
US 2003/0096841 og US 2003/0045552 og WO 02/059106. Representative
forbindelser er av formel II:



II

og farmasøytisk akseptable salter, hydrater, løsninger, klatrater, enantiomerer,
diastereomerer, racemater og blandinger av stereoisomerer derav, der:

én av X og Y er C=O og den andre er CH₂ eller C=O;

R¹ er H, (C₁-C₈)alkyl, (C₃-C₇)sykloalkyl, (C₂-C₈)alkenyl, (C₂-C₈)alkynyl, benzyl, aryl, (C₀-C₄)alkyl-(C₁-C₆)heterosykloalkyl, (C₀-C₄)alkyl-(C₂-C₅)heteroaryl, C(O)R³, C(S)R³, C(O)OR⁴, (C₁-C₈)alkyl-N(R⁶)₂, (C₁-C₈)alkyl-OR⁵, (C₁-C₈)alkyl-C(O)OR⁵,
 5 C(O)NHR³, C(S)NHR³, C(O)NR³R^{3'}, C(S)NR³R^{3'} eller (C₁-C₈)alkyl-O(CO)R⁵;

R² er H, F, benzyl, (C₁-C₈)alkyl, (C₂-C₈)alkenyl eller (C₂-C₈)alkynyl;

R³ og R^{3'} er uavhengig (C₁-C₈)alkyl, (C₃-C₇)sykloalkyl, (C₂-C₈)alkenyl, (C₂-C₈)alkynyl, benzyl, aryl, (C₀-C₄)alkyl-(C₁-C₆)heterosykloalkyl, (C₀-C₄)alkyl-(C₂-C₅)heteroaryl, (C₀-C₈)alkyl-N(R⁶)₂, (C₁-C₈)alkyl-OR⁵, (C₁-C₈)alkyl-C(O)OR⁵, (C₁-C₈)alkyl-O(CO)R⁵ eller C(O)OR⁵;
 10 C(O)OR⁵;

R⁴ er (C₁-C₈)alkyl, (C₂-C₈)alkenyl, (C₂-C₈)alkynyl, (C₁-C₄)alkyl-OR⁵, benzyl, aryl, (C₀-C₄)alkyl-(C₁-C₆)heterosykloalkyl eller (C₀-C₄)alkyl-(C₂-C₅)heteroaryl;

R⁵ er (C₁-C₈)alkyl, (C₂-C₈)alkenyl, (C₂-C₈)alkynyl, benzyl, aryl eller (C₂-C₅)heteroaryl;

15 hver forekomst av R⁶ er uavhengig H, (C₁-C₈)alkyl, (C₂-C₈)alkenyl, (C₂-C₈)alkynyl, benzyl, aryl, (C₂-C₅)heteroaryl, eller (C₀-C₈)alkyl-C(O)O-R⁵ eller R⁶-gruppene kan sammenføres for å danne en heterosykloalkylgruppe;

n er 0 eller 1; og

* representerer et kiralt karbonsenter.

20 **[0161]** I spesifikke forbindelser av formel II, når n er 0 da er R¹ (C₃-C₇)sykloalkyl, (C₂-C₈)alkenyl, (C₂-C₈)alkynyl, benzyl, aryl, (C₀-C₄)alkyl-(C₁-C₆)heterosykloalkyl, (C₀-C₄)alkyl-(C₂-C₅)heteroaryl, C(O)R³, C(O)OR⁴, (C₁-C₈)alkyl-N(R⁶)₂, (C₁-C₈)alkyl-OR⁵, (C₁-C₈)alkyl-C(O)OR⁵, C(S)NHR³, eller (C₁-C₈)alkyl-O(CO)R⁵;

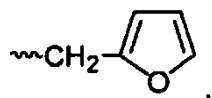
25 R² er H eller (C₁-C₈)alkyl; og

R³ er (C₁-C₈)alkyl, (C₃-C₇)sykloalkyl, (C₂-C₈)alkenyl, (C₂-C₈)alkynyl, benzyl, aryl, (C₀-C₄)alkyl-(C₁-C₆)heterosykloalkyl, (C₀-C₄)alkyl-(C₂-C₅)heteroaryl, (C₅-C₈)alkyl-N(R⁶)₂; (C₀-C₈)alkyl-NH-C(O)O-R⁵; (C₁-C₈)alkyl-OR⁵, (C₁-C₈)alkyl-C(O)OR⁵, (C₁-C₈)alkyl-O(CO)R⁵ eller C(O)OR⁵; og de andre variablene har de
 30 samme definisjonene.

[0162] I andre spesifikke forbindelser ifølge formel II, er R² H eller (C₁-C₄)alkyl.

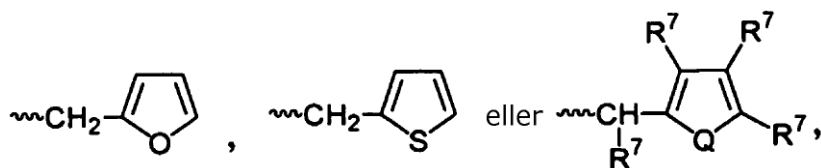
35 **[0163]** I andre spesifikke forbindelser ifølge formel II, er R¹ (C₁-C₈)alkyl eller benzyl.

[0164] I andre spesifikke forbindelser av formel II, er R^1 H, (C_1-C_8) alkyl, benzyl, CH_2OCH_3 , $CH_2CH_2OCH_3$ eller



5

[0165] I en annen utførelsesform av forbindelsene av formel II, er R^1



10 der Q er O eller S og hver forekomst av R^7 er uavhengig H, (C_1-C_8) alkyl, (C_3-C_7) sykloalkyl, (C_2-C_8) alkenyl, (C_2-C_8) alkynyl, benzyl, aryl, halogen, (C_0-C_4) alkyl- (C_1-C_6) heterosykloalkyl, (C_0-C_4) alkyl- (C_2-C_5) heteroaryl, (C_0-C_8) alkyl- $N(R^6)_2$, (C_1-C_8) alkyl- OR^5 , (C_1-C_8) alkyl- $C(O)OR^5$, (C_1-C_8) alkyl- $O(CO)R^5$, eller $C(O)OR^5$ eller nærliggende forekomster av R^7 kan føres sammen for å danne en bisyklisk alkyl- eller arylring.

15

[0166] I andre spesifikke forbindelser av formel II, er R^1 $C(O)R^3$.

[0167] I andre spesifikke forbindelser av formel II, er R^3 (C_0-C_4) alkyl- (C_2-C_5) heteroaryl, (C_1-C_8) alkyl, aryl eller (C_0-C_4) alkyl- OR^5 .

20

[0168] I andre spesifikke forbindelser av formel II er heteroaryl pyridyl, furyl eller tienyl.

[0169] I andre spesifikke forbindelser av formel II, er R^1 $C(O)R^4$.

25

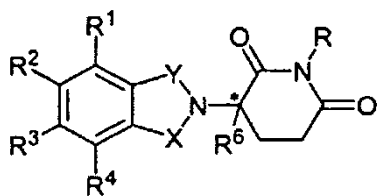
[0170] I andre spesifikke forbindelser av formel II kan H i $C(O)NHC(O)$ skiftes ut med (C_1-C_4) alkyl, aryl eller bezyl.

[0171] Videre eksempler på forbindelsene i denne klassen inkluderer, men er ikke begrenset til: [2-(2,6-diokso-piperidin-3-yl)-1,3-diokso-2,3-dihydro-1H-isoindol-4-ylmetyl]-amid; (2-(2,6-diokso-piperidin-3-yl)-1,3-diokso-2,3-dihydro-1H-isoindol-4-ylmetyl)-karbamidsyre *tert*-butylester; 4-(aminometyl)-2-(2,6-diokso(3-piperidyl))-

30

isoindolin-1,3-dion; *N*-(2-(2,6-diokso-piperidin-3-yl)-1,3-diokso-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-4-ylmetyl)-acetamid; *N*-{(2-(2,6-diokso(3-piperidyl))-1,3-dioksoisoindolin-4-yl)metyl}syklopropyl-karboksamid; 2-kloro-*N*-{(2-(2,6-diokso(3-piperidyl))-1,3-dioksoisoindolin-4-yl)metyl}acetamid; *N*-(2-(2,6-diokso(3-piperidyl))-1,3-dioksoisoindolin-4-yl)-3-pyridylkarboksamid; 3-{1-okso-4-(benzylamino)isoindolin-2-yl}piperidin-2,6-dion; 2-(2,6-diokso(3-piperidyl))-4-(benzylamino)isoindolin-1,3-dion; *N*-{(2-(2,6-diokso(3-piperidyl))-1,3-dioksoisoindolin-4-yl)metyl}propanamid; *N*-{(2-(2,6-diokso(3-piperidyl))-1,3-dioksoisoindolin-4-yl)metyl}-3-pyridylkarboksamid; *N*-{(2-(2,6-diokso(3-piperidyl))-1,3-dioksoisoindolin-4-yl)metyl}heptanamid; *N*-{(2-(2,6-diokso(3-piperidyl))-1,3-dioksoisoindolin-4-yl)metyl}-2-furylkarboksamid; {*N*-(2-(2,6-diokso(3-piperidyl))-1,3-dioksoisoindolin-4-yl)karbamoyl}metylacetat; *N*-(2-(2,6-diokso(3-piperidyl))-1,3-dioksoisoindolin-4-yl)pentanamid; *N*-(2-(2,6-diokso(3-piperidyl))-1,3-dioksoisoindolin-4-yl)-2-tienylkarboksamid; *N*-{[2-(2,6-diokso(3-piperidyl))-1,3-dioksoisoindolin-4-yl]metyl}(butylamino)karboksamid; *N*-{[2-(2,6-diokso(3-piperidyl))-1,3-dioksoisoindolin-4-yl]metyl}(oktylamino)karboksamid; og *N*-{[2-(2,6-diokso(3-piperidyl))-1,3-dioksoisoindolin-4-yl]metyl}(benzylamino)karboksamid.

[0172] Andre spesifikke immunmodulerende forbindelser tilhører imidlertid en klasse isoindole-imider offentliggjort i amerikansk patentsøknadpublikasjon nr. 2002/0045643, internasjonalt publikasjonsnr. WO 98/54170 og amerikansk patent nr. 6,395,754. Representative forbindelser er av formel III:



III

og farmasøytisk akseptable salter, hydrater, løsninger, klatrater, enantiomerer, diastereomerer, racemater og blandinger av stereoisomerer derav, der: én av X og Y er C=O og den andre er CH₂ eller C=O; R er H eller CH₂OCOR';

- (i) hver av R¹, R², R³ eller R⁴, uavhengig av de andre, er halo, alkyl med 1 til 4 karbonatomer, eller alkoksy med 1 til 4 karbonatomer eller (ii) én av R¹, R², R³ eller R⁴ er nitro eller -NHR⁵ og resten av R¹, R², R³ eller R⁴ er hydrogen;

R^5 er hydrogen eller alkyl med 1 til 8 karboner

R^6 hydrogen, alkyl med 1 til 8 karbonatomer, benzo, klor eller fluor;

R^1 er R^7 -CHR¹⁰-N(R^8R^9);

R^7 er m-fenylen eller p-fenylen eller $-(C_nH_{2n})-$ der n har en verdi fra 0 til 4;

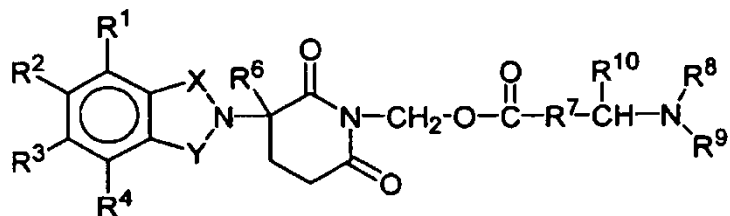
5 hver av R^8 og R^9 uavhengig av hverandre er hydrogen eller alkyl med 1 til 8 karbonatomer, eller R^8 og R^9 i fellesskap er tetrametylen, pentametylen, heksametylen, eller $-CH_2CH_2XCH_2CH_2-$ der X_1 er -O-, -S-, eller -NH-;

R^{10} er hydrogen, alkyl med til 8 karbonatomer eller fenyl; og

* representerer et kiralt karbonsenter,

10

[0173] Andre representative forbindelser er av formel:



15

der:

én av X og Y er C=O og den andre av X og Y er C=O eller CH₂;

(i) hver av R^1 , R^2 , R^3 eller R^4 , uavhengig av de andre, er halo, alkyl med 1 til 4 karbonatomer, eller alkoksy med 1 til 4 karbonatomer eller (ii) én av R^1 , R^2 , R^3 og R^4 er -NHR⁵ og resten av R^1 , R^2 , R^3 og R^4 er hydrogen;

20

R^5 er hydrogen eller alkyl med 1 til 8 karbonatomer;

R^6 hydrogen, alkyl med 1 til 8 karbonatomer, benzo, klor eller fluor;

R^7 er m-fenylen eller p-fenylen eller $-(C_nH_{2n})-$ der n har en verdi fra 0 til 4;

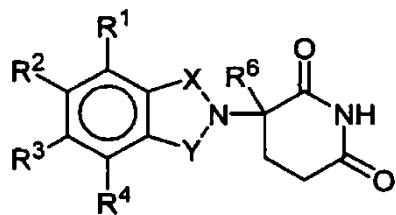
hver av R^8 og R^9 uavhengig av hverandre er hydrogen eller alkyl med 1 til 8 karbonatomer, eller R^8 og R^9 i fellesskap er tetrametylen, pentametylen,

25

heksametylen, eller $-CH_2CH_2X^1CH_2CH_2-$ der X^1 er -O-, -S-, eller -NH-;

R^{10} er hydrogen, alkyl med til 8 karbonatomer eller fenyl.

[0174] Andre representative forbindelser er av formel:



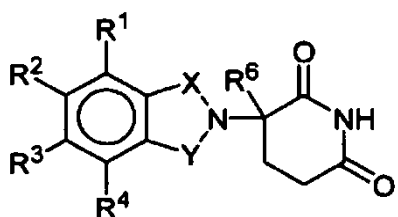
30

der

én av X og Y er C=O og den andre av X og Y er C=O eller CH₂;

- (i) hver av R¹, R², R³ eller R⁴, uavhengig av de andre, er halo, alkyl med 1 til 4 karbonatomer, eller alkoksy med 1 til 4 karbonatomer eller (ii) én av R¹, R², R³ og R⁴ er nitro eller beskyttet amino og resten av R¹, R², R³ og R⁴ er hydrogen; og R⁶ hydrogen, alkyl med 1 til 8 karbonatomer, benzo, klor eller fluor.

[0175] Andre representative forbindelser er av formel:

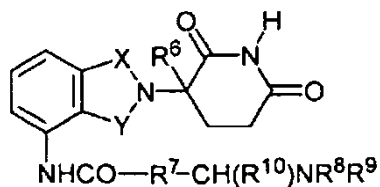


der:

én av X og Y er C=O og den andre av X og Y er C=O eller CH₂;

- (i) hver av R¹, R², R³ eller R⁴, uavhengig av de andre, er halo, alkyl med 1 til 4 karbonatomer, eller alkoksy med 1 til 4 karbonatomer eller (ii) én av R¹, R², R³ og R⁴ er -NHR⁵ og resten av R¹, R², R³ og R⁴ er hydrogen; R⁵ er hydrogen, alkyl av 1 til 8 karbonatomer eller CO-R⁷-CH(R¹⁰)NR⁸R⁹, der hver av R⁷, R⁸, R⁹ og R¹⁰ er som definert heri; og R⁶ alkyl med 1 til 8 karbonatomer, benzo, klor eller fluor.

[0176] Spesifikke eksempler på forbindelsene er av formel:



der:

én av X og Y er C=O og den andre av X og Y er C=O eller CH₂;

R⁶ hydrogen, alkyl med 1 til 8 karbonatomer, benzyl, klor eller fluor;

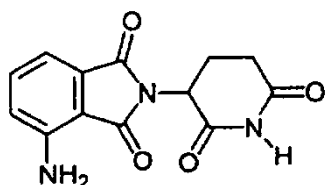
R⁷ er m-fenylen eller p-fenylen eller -(C_nH_{2n})- der n har en verdi fra 0 til 4;

hver av R^8 og R^9 uavhengig av hverandre er hydrogen eller alkyl med 1 til 8 karbonatomer, eller R^8 og R^9 i fellesskap er tetrametylen, pentametylen, heksametylen, eller $-CH_2CH_2X^1CH_2CH_2-$ der X^1 er $-O-$, $-S-$, eller $-NH-$; og R^{10} er hydrogen, alkyl med 1 til 8 karbonatomer eller fenyl.

5

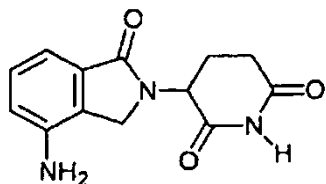
[0177] De mest foretrukne immunmodulerende forbindelsene er 4-(amino)-2-(2,6-diokso(3-piperidyl))-isoindolin-1,3-dion og 3-(4-amino-1-okso-1,3-dihydro-isoindol-2-yl)-piperidin-2,6-dion. Forbindelsene kan oppnås ved standard syntetiske fremgangsmåter (se f.eks. amerikansk patent nr. 5,635,517). Disse forbindelsene er tilgjengelige fra Celgen Corporation, Warren, NJ. 4-(amino)-2-(2,6-diokso(3-piperidyl))-isoindolin-1,3-dion har den følgende kjemiske strukturen:

10



15

[0178] Forbindelsen 3-(4-amino-1-okso-1,3-dihydro-isoindol-2-yl)-piperidin-2,6-dion har den følgende kjemiske strukturen:



20

[0179] I en annen utførelsesform innbefatter spesifikke immunmodulerende forbindelser polymorfe former av 3-(4-amino-1-okso-1,3 dihydro-isoindol-2-yl)-piperiden-2,6-dion, slik som form A, B, C, D, E, F, G og H, offentliggjort i amerikansk publikasjonsnr. US 2005/0096351 A1. Form A av 3-(4-amino-1-okso-1,3 dihydro-isoindol-2-yl)-piperiden-2,6-dion er f.eks. et ikke-oppløst, krystallisk materiale som kan oppnås fra ikke-vandige løsningssystemer. Form A har et røntgenpulverdiffraksjonsmønster omfattende signifikante topper ved omtrent 8, 14,5, 16, 17,5, 20,5, 24 og 26 grader 2θ , og har en maksimumstemperatur for skanningsdifferensialkalorimetrismelting på omtrent 270 °C. Form A er svakt eller ikke hygroskopisk og synes å være den

25

termodynamisk mest stabile vannfrie polymorfen av 3-(4-amino-1-okso-1,3 dihydro-isoindol-2-yl)-piperidin-2,6-dion oppdaget så langt.

5 **[0180]** Form B av 3-(4-amino-1-okso-1,3 dihydro-isoindol-2-yl)-piperiden-2,6-dion er et hemihydrert, krystallisk materiale som kan oppnås fra forskjellige løsningssystemer, inkludert, men ikke begrenset til heksan, toluen og vann. Form B har et røntgenpulverdiffraksjonsmønster omfattende signifikante topper ved omtrent 16, 18, 22 og 27 grader 2θ og har endotermer fra DSC-kurven på omtrent 146 og 268 °C, som er identifisert dehydrering og 10 smelting ved varmestadiummikroskopieksperimenter. Interkonverteringsstudier viser av form B konverterer til form E i vandige løsningsystemer og konverterer til andre former i aceton og andre vannfrie systemer.

15 **[0181]** Form C av 3-(4-amino-1-okso-1,3 dihydro-isoindol-2-yl)-piperiden-2,6-dion er et hemiopløst krystallisk materiale som kan oppnås fra løsemidler slik som, men ikke begrenset til, aceton. Form C har et røntgenpulverdiffraksjonsmønster omfattende signifikante topper ved omtrent 15,5 og 25 grader 2θ og har en maksimumstemperatur for skanningsdifferensialkalorimetrismelting på omtrent 269 °C. Form C er ikke hygroskopisk under omtrent 85 % RH, men kan konvertere 20 til form B ved høyere relative luftfuktigheter.

25 **[0182]** Form D av 3-(4-amino-1-okso-1,3 dihydro-isoindol-2-yl)-piperiden-2,6-dion er en krystallisk, oppløst polymorf fremstilt fra en blanding av acetonitril og vann. Form D har et røntgenpulverdiffraksjonsmønster omfattende signifikante topper ved omtrent 27 og 28 grader 2θ og har en maksimumstemperatur for skanningsdifferensialkalorimetrismelting på omtrent 270 °C. Form D er enten svakt eller ikke hygroskopisk, men vil som regel konvertere til form B ved høyere relative luftfuktigheter.

30 **[0183]** Form E av 3-(4-amino-1-okso-1,3 dihydro-isoindol-2-yl)-piperiden-2,6-dion er et dihydrert, krystallisk materiale som kan oppnås ved slurrying av 3-(4-amino-1-okso-1,3 dihydro-isoindol-2-yl)-piperiden-2,6-dion i vann og ved sakte avdamping av 3-(4-amino-1-okso-1,3 dihydro-isoindol-2-yl)-piperiden-2,6-dion i et 35 løsningssystem med et forhold på omtrent 9:1 aceton:vann. Form E har et røntgenpulverdiffraksjonsmønster omfattende signifikante topper ved omtrent 20, 24,5 og 29 grader 2θ og har en maksimumstemperatur for skanningsdifferensialkalorimetrismelting på omtrent 269 °C. Form E kan konvertere

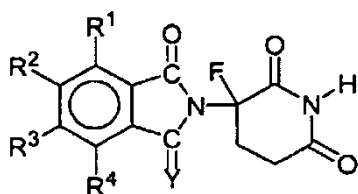
til form C i et aceton løsningssystem og til form G i et THF-løsningssystem. I vandige løsningssystemer synes form E å være den mest stabile formen. Avoppløsningseksperimenter utført på form E viser at ved oppvarming ved omtrent 125 °C i omtrent fem minutter, viser at form E kan konvertere til form B. Ved oppvarming ved 175 °C i omtrent fem minutter, kan form B konvertere til form F.

[0184] Form F av 3-(4-amino-1-okso-1,3 dihydro-isoindol-2-yl)-piperiden-2,6-dion er et ikke-løst, krystallisk materiale som kan oppnås fra dehydreringen av form E. Form F har et røntgenpulverdiffraksjonsmønster omfattende signifikante topper ved omtrent 19, 19,5 og 25 grader 2θ og har en maksimumstemperatur for skanningsdifferensialkalorimetrismelting på omtrent 269 °C.

[0185] Form G av 3-(4-amino-1-okso-1,3 dihydro-isoindol-2-yl)-piperiden-2,6-dion er et ikke-løst, krystallisk materiale som kan oppnås fra slurrying form B og E i et løsemiddel slik som, men ikke begrenset til, tetrahydrofuran (THF). Form G har et røntgenpulverdiffraksjonsmønster omfattende signifikante topper ved omtrent 21, 23 og 24,5 grader 2θ og har en maksimumstemperatur for skanningsdifferensialkalorimetrismelting på omtrent 267 °C.

[0186] Form H av 3-(4-amino-1-okso-1,3 dihydro-isoindol-2-yl)-piperiden-2,6-dion er et delvis hydrert (omtrent 0,25 mol) krystallisk materiale som kan oppnås ved å eksponere form E for 0 % relativ luftfuktighet. Form H har et røntgenpulverdiffraksjonsmønster omfattende signifikante topper ved omtrent 15, 26 og 31 grader 2θ og har en maksimumstemperatur for skanningsdifferensialkalorimetrismelting på omtrent 269 °C.

[0187] Andre spesifikke immunmodulerende forbindelser anvendelige i fremgangsmåtene som tilveiebringes heri inkluderer, men er ikke begrenset til 1-okso-2-(2,6-diokso-3-fluoropiperidin-3-yl) isoindoliner og 1,3-diokso-2-(2,6-diokso-3-fluoropiperidin-3-yl) isoindoliner slik som dem beskrevet i amerikansk patent nr. 5,874,448 og 5,955,476. Representative forbindelser er av formel:



der Y er oksygen eller H² og

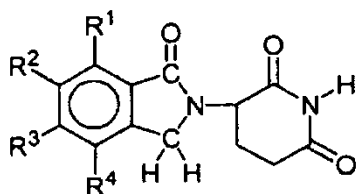
hver av R¹, R², R³ og R⁴ er, uavhengig av de andre, hydrogen, halo, alkyl med 1 til 4 karbonatomer, alkoksy med 1 til 4 karbonatomer eller amino.

5

[0188] Andre spesifikke immunmodulerende forbindelser anvendelig i fremgangsmåtene som tilveiebringes heri inkluderer, men er ikke begrenset til, tetra-substitutert 2-(2,6-dioksopiperdin-3-yl)-1-oksoisoindoliner beskrevet i amerikansk patent nr. 5,798,368.

10

[0189] Representative forbindelser er av formel:

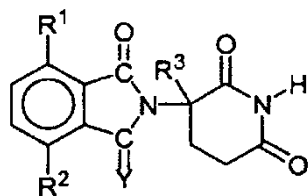


15

der hver av R¹, R², R³ og R⁴, uavhengig av de andre, er halo, alkyl med 1 til 4 karbonatomer eller alkoksy med 1 til 4 karbonatomer.

[0190] Andre spesifikke immunmodulerende forbindelser som kan anvendes i fremgangsmåtene som tilveiebringes heri inkluderer, men er ikke begrenset til 1-okso ig 1,3-diokso-2-(2,6-dioksopiperidin-3-yl) isoindoliner offentliggjort i amerikansk patent nr. 6,403,613. Representative forbindelser er av formel:

20



25

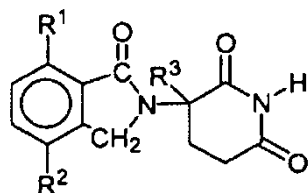
der

Y er oksygen eller H₂,

en første av R¹ og R² er halo, alkyl, alkoksy, alkylamino, dialkylamino, cyano eller karbamoyl, den andre av R¹ og R², uavhengig av den første, er hydrogen, halo, alkyl, alkoksy, alkylamino, dialkylamino, cyano eller karbamoyl og

R^3 er hydrogen, alkyl eller benzyl.

[0191] Spesifikke eksempler på forbindelsene er av formel:



5

der en første av R^1 og R^2 er halo, alkyl med fra 1 til 4 karbonatomer, alkoksy med fra 1 til 4 karbonatomer, dialkylamino, der hvert alkyl har fra 1 til 4 karbonatomer, cyano eller karbamoyl,

10

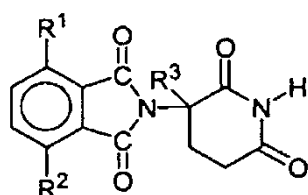
den andre av R^1 og R^2 , uavhengig av den første, er hydrogen, halo, alkyl med fra 1 til 4 karbonatomer, alkoksy med fra 1 til 4 karbonatomer, alkylamino, der alkyl har fra 1 til 4 karbonatomer, dialkylamino, der hvert alkyl har fra 1 til 4 karbonatomer, cyano eller karbamoyl og

R^3 er hydrogen, alkyl med fra 1 til 4 karbonatomer eller benzyl. Spesifikke eksempler inkluderer, men er ikke begrenset til 1-okso-2-(2,6-dioksopiperidin-3-yl)-4-metylisindolin.

15

[0192] Andre forbindelser som kan anvendes i fremgangsmåtene som tilveiebringes heri er av formel:

20



der en første av R^1 og R^2 er halo, alkyl med fra 1 til 4 karbonatomer, alkoksy med fra 1 til 4 karbonatomer, dialkylamino, der hvert alkyl har fra 1 til 4 karbonatomer, cyano eller karbamoyl,

25

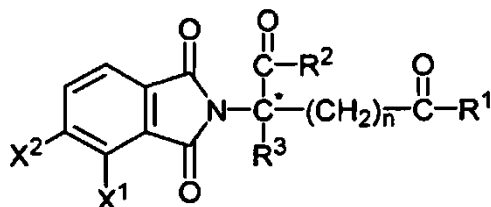
den andre av R^1 og R^2 , uavhengig av den første, er hydrogen, halo, alkyl med fra 1 til 4 karbonatomer, alkoksy med fra 1 til 4 karbonatomer, alkylamino, der

alkyl har fra 1 til 4 karbonatomer, dialkylamino, der hvert alkyl har fra 1 til 4 karbonatomer, cyano eller karbamoyl og

R^3 er hydrogen, alkyl med fra 1 til 4 karbonatomer eller benzyl.

- 5 **[0193]** Andre spesifikke immunmodulerende forbindelser som kan anvendes i fremgangsmåtene som tilveiebringes heri inkluderer, men er ikke begrenset til, 1-okso og 1,3-dioksoisindoliner substituert i 4- eller 5-posisjonen på indolinringen beskrevet i amerikansk patent nr. 6,380,239 og amerikansk søknadspublikasjon nr. 2006/0084815. Representative forbindelser er av formel:

10

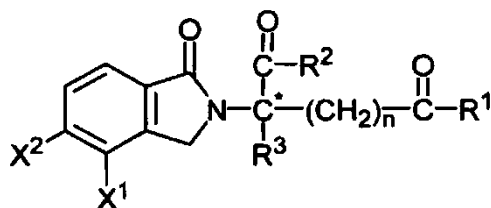


der karbonatomet betegnet som C* utgjør et kiralitetssenter (når n ikke er null og R^1 ikke er den samme som R^2); én av X^1 og X^2 er amino, nitro, alkyl med ett til seks karboner, eller NH-Z, og den andre av X^1 eller X^2 er hydrogen; hver av R^1 og R^2 uavhengig av den andre er hydrokso eller NH-Z; R^3 er hydrogen, alkyl med ett til seks karboner, halo eller haloalkyl; Z er hydrogen, aryl, alkyl med ett til seks karboner, formyl eller acyl med ett til seks karboner; og n har en verdi på 0, 1 eller 2; forutsatt at hvis X^1 er amino og n er 1 eller 2, da er R^1 og R^2 ikke begge hydrokso; og saltene derav.

15

20

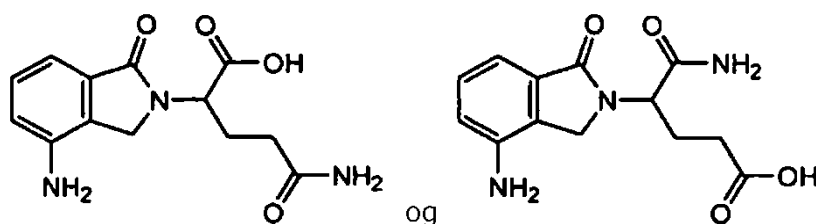
[0194] Andre forbindelser som kan anvendes i fremgangsmåtene som tilveiebringes heri er av formel:



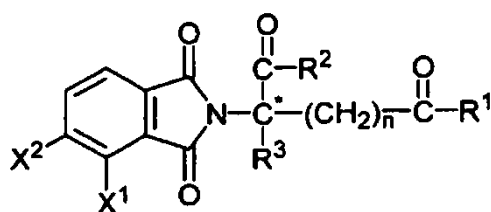
25

der karbonatomet betegnet som C* utgjør et kiralitetssenter når n ikke er null og R¹ ikke er R²; én av X¹ og X² er amino, nitro, alkyl med ett til seks karboner eller NH-Z, og den andre av X¹ eller X² er hydrogen; hver av R¹ og R² uavhengig av den andre, er hydroksy eller NH-Z; R³ er alkyl med ett til seks karboner, halo eller hydrogen; Z er hydrogen, aryl eller et alkyl eller acyl med ett til seks karboner; og n har en verdi på 0, 1 eller 2.

[0195] Spesifikke eksempler på forbindelser som kan anvendes i fremgangsmåtene som tilveiebringes heri inkluderer, men er ikke begrenset til, 2-(4-amino-1-okso-1,3-dihydro-isoindol-2-yl)-4-karbamoyl-smørsyre og 4-(4-amino-1-okso-1,3-dihydro-isoindol-2-yl)-4-karbamoyl-smørsyre, som henholdsvis har følgende strukturer, og farmasøytisk akseptable salter, løsninger, prolegemidler og stereoisomerer derav:

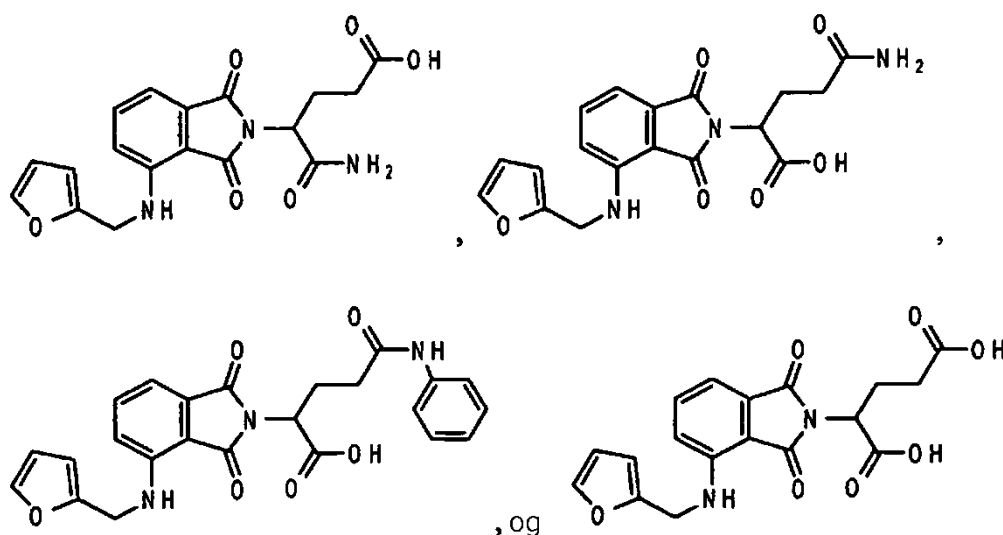


[0196] Andre representative forbindelser er av formel:

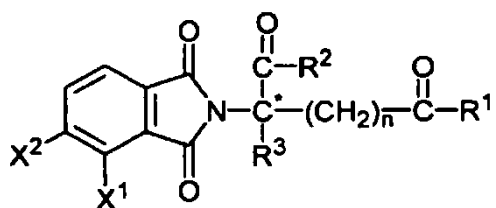


der karbonatomet betegnet som C* utgjør et kiralitetssenter når n ikke er null og R¹ ikke er R²; én av X¹ og X² er amino, nitro, alkyl med ett til seks karboner eller NH-Z, og den andre av X¹ eller X² er hydrogen; hver av R¹ og R² uavhengig av den andre, er hydroksy eller NH-Z; R³ er alkyl med ett til seks karboner, halo eller hydrogen; Z er hydrogen, aryl eller et alkyl eller acyl med ett til seks karboner; og n har en verdi på 0, 1 eller 2; og saltene derav.

[0197] Spesifikke eksempler inkluderer, men er ikke begrenset til, 4-karbamoyl-4-{4-[(furan-2-yl-metyl)-amino]-1,3-diokso-1,3-dihydro-isoindol-2-yl}-smørsyre, 4-karbamoyl-2-{4-[(furan-2-yl-metyl)-amino]-1,3-diokso-1,3-dihydro-isoindol-2-yl}-smørsyre, 2-{4-[(furan-2-yl-metyl)-amino]-1,3-diokso-1,3-dihydro-isoindol-2-yl}-4-phenylkarbamoyl-smørsyre og 2-{4-[(furan-2-yl-metyl)-amino]-1,3-diokso-1,3-dihydro-isoindol-2-yl}-pentanedioinsyre, som har følgende henholdsvis strukturer, og farmasøytiske akseptable salter, løsninger, prolegemidler og stereoisomerer derav:



[0198] Spesifikke eksempler på forbindelsene er av formel:



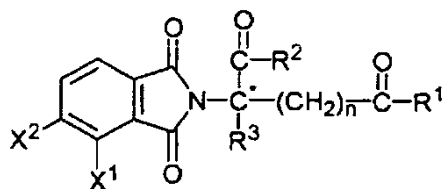
der én av X^1 og X^2 er nitro, eller NH-Z og den andre av X^1 eller X^2 er hydrogen;
hver av R^1 og R^2 , uavhengig av den andre, er hydroksy eller NH-Z;
 R^3 er alkyl med ett til seks karboner, halo eller hydrogen;
Z er hydrogen, fenyl, et acyl med ett til seks karboner, eller et alkyl med ett til seks karboner; og

n har en verdi på 0, 1 eller 2;

forutsatt at hvis én av X^1 og X^2 er nitro, og n er 1 eller 2, da er R^1 og R^2 annet enn hydroksy; og

hvis $-\text{COR}^2$ og $-(\text{CH}_2)_n\text{COR}^1$ er forskjellig, utgjør karbonatomet betegnet C^* et

5 kiralitetssenter. Andre representative forbindelser er av formel:



der én X^1 og X^2 er alkyl med ett til seks karboner:

10 hver av R^1 og R^2 , uavhengig av den andre, er hydroksy eller NH-Z ;

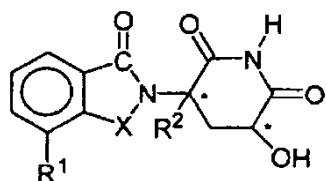
R^3 er alkyl med ett til seks karboner, halo eller hydrogen;

Z er hydrogen, fenyl, et acyl med ett til seks karboner, eller et alkyl med ett til seks karboner; og

n har en verdi på 0, 1 eller 2; og

15 hvis $-\text{COR}^2$ og $-(\text{CH}_2)_n\text{COR}^1$ er forskjellig, utgjør karbonatomet betegnet C^* et kiralitetssenter.

[0199] Enda andre spesifikke immunmodulerende forbindelser inkluderer, men er ikke begrenset til, isoindolin-1-on og isoindolin-1,3-dion substituert i 2-
20 posisjon med 2,6-diokso-3-hydroksypiperidin-5-yl beskrevet i amerikansk patent nr. 6,458,810. Representative forbindelser er av formel:



25 der:

karbonatomene betegnet * utgjør kiralitetssentre;

X er $-\text{C}(\text{O})-$ eller $-\text{CH}_2-$;

R^1 er alkyl med 1 til 8 karbonatomer eller $-\text{NHR}^3$;

R^2 er hydrogen eller alkyl med 1 til 8 karbonatomer eller halogen;

30 og

R^3 er hydrogen;

alkyl med 1 til 8 karbonatomer, ikke-substituert eller substituert med alkoksy med 1 til 8 karbonatomer, halo, amino eller alkylamino med 1 til 4 karbonatomer, sykloalkyl med 3 til 18 karbonatomer.

5 fenyl, ikke-substituert eller substituert med alkyl med 1 til 8 karbonatomer, alkoksy med 1 til 8 karbonatomer, halo, amino eller alkylamino med 1 til 4 karbonatomer, benzyl, ikke-substituert eller substituert med alkyl med 1 til 8 karbonatomer, alkoksy med 1 til 8 karbonatomer, halo, amino eller alkylamino med 1 til 4 karbonatomer eller $-COR^4$, der

10 R^4 er hydrogen, alkyl med 1 til 8 karbonatomer, ikke-substituert eller substituert med alkoksy med 1 til 8 karbonatomer, halo, amino eller alkylamino med 1 til 4 karbonatomer, sykloalkyl med 3 til 18 karbonatomer.

15 fenyl, ikke-substituert eller substituert med alkyl med 1 til 8 karbonatomer, alkoksy med 1 til 8 karbonatomer, halo, amino eller alkylamino med 1 til 4 karbonatomer, eller benzyl, ikke-substituert eller substituert med alkyl med 1 til 8 karbonatomer, alkoksy med 1 til 8 karbonatomer, halo, amino eller alkylamino med 1 til 4 karbonatomer.

20

[0200] Forbindelsene som tilveiebringes heri kan enten anskaffes kommersielt eller fremstilles ifølge fremgangsmåtene beskrevet i patentene eller patentpublikasjonene offentliggjort heri. Optisk rene forbindelser kan videre syntetiseres asymmetrisk eller løses opp ved kjente oppløsningsmidler eller kiralkolonner, samt andre standardteknikker i organisk kjemi.

25

[0201] Forskjellige immunmodulerende forbindelser inneholder ett eller flere kiralsentre, og kan forekomme som racemiske blandinger av enantiomerer eller blandinger av diastereoisomerer. Anvendelsen av stereomerisk rene former av slike forbindelser, samt anvendelse av blandinger av disse formene er innbefattet. Blandinger omfattende like eller ulike mengder av enantiomerer av en bestemt immunmodulerende forbindelse kan f.eks. anvendes i fremgangsmåtene og sammensetningene som tilveiebringes heri. Disse isomerene kan syntetiseres asymmetrisk eller løses opp ved anvendelse av standardteknikker, slik som kiralkolonner eller kiraloopløsningsmiddel. Se f.eks. Jacques, J., et al., *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley-Interscience, New York, 1981); Wilen, S. H., et al., *Tetrahedron* 33:2725

30
35

(1977); Eliel, E. L., Stereochemistry of Carbon Compounds (McGraw-Hill, NY, 1962); og 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).

- 5 **[0202]** Det må bemerkes at hvis det foreligger diskrepans mellom en beskrevet struktur og et navn gitt den strukturen, skal den beskrevne strukturen tillegges mer vekt. Hvis stereokjemien for en struktur eller en del av en struktur ikke angis med, f.eks. fet type eller stiplet linje, skal strukturen eller delen av strukturen i tillegg tolkes som innbefattende alle stereoisomerene av den.

10

5.9. Administrering av PINK-celler, humant placentaperfusat eller kombinerte naturlige dreperceller

15

[0203] PINK-cellene, de humane placentaperfusatcellene, de kombinerte naturlige drepercellene, populasjoner omfattende slike celler eller kombinasjoner derav, kan administreres til et individ, f.eks. et individ med tumorceller, f.eks. en kreftpasient, på en hvilken som helst medisinsk akseptabel måte kjent i faget egnet for administrering av levende celler. I forskjellige utførelsesformer kan cellene som tilveiebringes heri implanteres kirurgisk, injiseres, infuseres, f.eks. ved anvendelse av kateter eller sprøyte eller administreres på annen måte enten direkte eller indirekte til stedet i behov av reparasjon eller forsterkning. I én utførelsesform administreres cellene intravenøst til et individ. I en annen utførelsesform administreres cellene til individet ved et tumorsted, f.eks. en solid tumor. I en spesifikk utførelsesform der individet har en tumor på mer enn ett

20 sted, administreres cellene ved minst to, eller alle tumorstedene. I bestemte andre utførelsesformer administreres cellene som tilveiebringes heri, eller sammensetningen omfattende cellene nasalt, intraarterielt, parenteralt, oftalmisk, intramuskulært, subkutan, intraperitonealt, intracerebralt, intraventrikulært, intracerebroventrikulært, intratekalsk, intracisternalsk, intraspinalt og/eller

25 perispinalt. I bestemte utførelsesformer leveres cellene via intrakranielle eller intraspinalle nåler og/eller katetre med eller uten pumpeanordninger.

30

35

[0204] PINK-celler, humane placentaperfusatceller, kombinerte naturlige dreperceller eller kombinasjoner derav eller cellepopulasjoner omfattende slike celler kan administreres til et individ i en sammensetning, f.eks. en matrise, hydrogel, stillas eller lignende som omfatter celler.

[0205] I en utførelsesform sås cellene som tilveiebringes heri på en naturlig matrise, *f.eks.* et biomateriale fra placenta, slik som et fosterhinnemateriale. Et slikt amnionmembranmateriale kan *f.eks.* være fosterhinnemembran dissekert direkte fra et pattedyrplacenta; fiksert eller varmebehandlet fosterhinnemembran, hovedsakelig tørr (*dvs.* < 20 % H₂O) fosterhinnemembran, chorionmembran, hovedsakelig tørr chorionmembran, hovedsakelig tørr amnion- og chorionmembran og lignende. Foretrukne biomaterialer fra placenta som placentastamceller kan sås på beskrives i Hariri, amerikansk søknadspublikasjonnr. 2004/0048796.

[0206] I en annen utførelsesform suspenderes PINK-celler, humane placentaperfusatceller, kombinerte naturlige dreperceller eller kombinasjoner derav, eller populasjoner omfattende slike celler i en hydrogeløsning egnet for, *f.eks.* for injeksjon. Egnede hydrogeler for slike sammensetninger inkluderer selvsammenstillingspeptider, slik som RAD16. I én utførelsesform kan en hydrogelløsning omfattende cellene få herde, *f.eks.* i en form, for å danne en matrise som har celler dispergert deri for implantasjon. Cellene i en slik matrise kan også dyrkes slik at cellene ekspanderes mitotisk før implantasjon. Hydrogelet kan *f.eks.* være en organisk polymer (naturlig eller syntetisk) som er kryssbundet via kovalente bindinger, ioniske bindinger eller hydrogenbindinger for å danne en tredimensjonal åpen gitterstruktur som stenger inne vannmolekyler for å danne en gel. Hydrogeldannende materialer inkluderer polysakkarider slik som alginat og salter derav, peptider, polyfosfaziner og polyakrylater, som er kryssbundet ionisk, eller blokkpolymerer slik som polyetylenoksid-polypropylenglykolblokk-kopolymerer som er kryssbundet av henholdsvis temperatur eller pH. I noen utførelsesformer er hydrogelen eller matrise ifølge oppfinnelsen bionedbrytbare.

[0207] I noen utførelsesformer av oppfinnelsen omfatter formuleringen en *in situ* polymeriserbar gel (se *f.eks.* amerikansk patentsøknadspublikasjon nr. 2002/0022676; Anseth et al., J. Control Release, 78(1-3):199-209 (2002); Wang et al., Biomaterials, 24(22):3969-80 (2003).

[0208] I noen utførelsesformer er polymerene minst delvis løselige i vandige løsninger, slik som vann, bufrede saltløsninger eller vandige alkoholløsninger, som har ladde sidegrupper, eller et monovalent ionisk salt derav. Eksempler på polymerer med sure sidegrupper som kan reageres med kationer, er poly(fosfazener), poly(akrylsyrer), poly(metakrylsyrer), kopolymerer av akrylsyre og metakrylsyre, poly(vinylacetat) og sulfonerte polymerer, slik som

sulfonert polystyren. Det kan også anvendes kopolymerer som har sure sidegrupper dannet ved reaksjon av akryl- eller metakrylsyre og vinyletermonomerer eller -polymerer. Eksempler på sure grupper er karboksylsyregrupper, svovelsyregrupper, halogenerte (foretrukket fluorinerte) alkoholgrupper, fenole OH-grupper og sure OH-grupper.

[0209] Stamceller fra placenta ifølge oppfinnelsen eller felleskulturer derav kan sås på et tredimensjonalt rammeverk eller en struktur og implanteres *in vivo*. En slik struktur kan implanteres i kombinasjon med en hvilken som helst én eller flere vekstfaktorer, celler, legemiddel eller andre komponenter som stimulerer vevsdannelse eller ellers forbedrer praktiseringen av oppfinnelsen.

[0210] Eksempler på strukturer som kan anvendes i den foreliggende oppfinnelsen inkluderer ikke-vevde matter, porøst skum eller selvorganiserende peptider. Ikke-vevde matter kan dannes ved hjelp av fibre omfattet av en syntetisk absorberbar kopolymer av glykol- og melkesyrer (*f.eks.* PGA/PLA) (VICRYL, Ethicon, Inc Somerville, N.J.). Skum, sammensatt av *f.eks.* poly(ϵ -kaprolakton)/poly(glykolsyre) (PCL/PGA)-kopolymer, dannet av prosesser slik som frysetørking (se *f.eks.* amerikansk patent nr. 6 355 699), kan også anvendes som strukturer.

[0211] Stamceller fra placenta ifølge oppfinnelsen kan også sås på eller settes i kontakt med et fysiologisk akseptabelt keramisk materiale, inkludert, men ikke begrenset til, mono-, di-, tri-, alfa-tri-, beta-tri- og tetra-kalsiumfosfat, hydroksyapatitt, fluorapatitter, kalsiumsulfater, kalsiumfluorider, kalsiumoksider, kalsiumkarbonater, magnesiumkalsiumfosfater, biologisk aktive glass slik som BIOGLASS® og blandinger derav. Porøse biokompatible keramiske materialer som for øyeblikket er kommersielt tilgjengelige, inkluderer SURGIBONE® (CanMedica Corp Canada), ENDOBON® (Merck Biomaterial France, Frankrike), CEROS® (Mathys, AG, Bettlach, Sveits) og mineraliserte kollagenbentransplantasjonsprodukter slik som HEALOS™ (DePuy, Inc Raynham, MA) og VITOSS®, RHAKOSS™ og CORTOSS® (Orthovita, Malvern, Pa.). Strukturen kan være en blanding eller kompositt av naturlige og/eller syntetiske materialer.

[0212] I en annen utførelsesform kan stamceller fra placenta sås på, eller settes i kontakt med et felt som *f.eks.* kan være sammensatt av et multifilamentgarn dannet fra et bioabsorberbart materiale slik som PGA-, PLA-, PCL-kopolymerer eller blandinger, eller hyaluronsyre.

[0213] Oppfinnelsens stamceller fra placenta kan i en annen utførelsesform sås på skumstrukturer som kan være komposittstrukturer. Slike skumstrukturer kan formes til en nyttig form, slik som den for en del av en spesifikk struktur i legemet som skal repareres, utbyttes eller økes. I noen utførelsesformer behandles strukturen *f.eks.* med 0,1 M eddiksyre etterfulgt av inkubasjon i polylysin, PBS og/eller kollagen, før inokulering av cellene ifølge oppfinnelsen for å forbedre cellebindingen. Eksterne overflater av en matrise kan modifiseres for å forbedre bindingen eller veksten av celler og differensieringen av vev, slik som ved plasmaovertrekking av matrisen, eller tilsetning av ett eller flere proteiner (*f.eks.* kollagener, elastiske fibre, retikulære fibre), glykoproteiner, glykosaminoglykaner (*f.eks.* heparinsulfat, kondroitin-4-sulfat, kondroitin-6-sulfat, dermatansulfat, keratinsulfat osv.), en cellulær matrise og/eller andre materialer slik som blant annet gelatin, alginater, agar, agarose og plantegummier og lignende.

[0214] I noen utførelsesformer omfatter strukturen, eller den er behandlet med, materialer som gjør den ikke-trombogen. Disse behandlingene og materialene kan også fremme og opprettholde endotel vekst, migrering og ekstracellulær matriseavsetning. Eksempler på disse materialene og behandlingene inkluderer, men er ikke begrenset til, naturlige materialer slik som basalmembranproteiner slik som laminin og type IV-kollagen, syntetiske materialer slik som EPTFE og segmenterte polyuretanureasilikoner, slik som PURSPAN™ (The Polymer Technology Group, Inc Berkeley, Calif.). Strukturen kan også omfatte antitrombotiske midler slik som heparin; strukturene kan også behandles for å endre overflateladningen (*f.eks.* overtrekking med plasma) før såing med stamceller fra placenta.

6. EKSEMPLER

6.1. Eksempel 1: Karakterisering av placentaderiverte intermediære naturlige dreperceller fra placentaperfusat og navlestrengblod

[0215] Det foreliggende eksemplet demonstrerer *f.eks.* isoleringen og dyrkingen av naturlige dreperceller fra humant placentaperfusat.

[0216] *Isolering av naturlige dreperceller fra placenta.* Naturlige dreperceller ble isolert fra 8 enheter humant placentaperfusat (HPP) og fra 4 enheter navlestrengblod (UCB) ved anvendelse av CD56-konjugerte mikrokuler. Isolering av

PINK-celler ble gjennomført ved magnetisk kulevelging (Miltenyi Biotec). Post-partum-placentaen ble tømt for blod og perfundert med omtrent 200 til omtrent 750 ml perfusjonsløsning (0,9 % NaCl-injeksjonsløsning USP-grad (kat.nr. 68200-804, VWR). Det ubehandlede perfusatet ble samlet inn og behandlet for å fjerne erytrocytter. Mononukleære celler fra HPP eller UCB ble vasket én gang med fluorescensaktivert celledatering (FACS)-buffer (RPMI 1640 uten fenolrødt, pluss 5 % FBS), deretter sentrifugert ved 1500 opm i 6 min. Celleantallet ble talt og cellepelleten ble suspendert på nytt i 80 µl buffer pr. 10^7 totalt antall celler med 20 µl med CD3-mikrokuler (katalognr. 130-050-101, Miltenyi). Systemet ble blandet godt og inkubert i 15 minutter ved 4–8 °C. 1–2 ml med buffer pr. 10^7 totalt antall celler ble tilsatt og blandingen ble deretter sentrifugert ved 300 g i 10 minutter. Supernatanten ble pipetert fullstendig av. Cellepelleten ble på nytt suspendert i opptil 10^8 celler i 500 µl av buffer og tilberedes for magnetisk separasjon. En LS-kolonne (Miltenyi Biotec) ble plassert i magnetfeltet til en MIDIMACS™ cellseparator (Miltenyi Biotec), 3 ml buffer ble påført for å skylle kolonnen og celle-/mikrokulesuspensjonen ble påført kolonnen. Umerkede CD3⁺-celler, som passerte gjennom kolonnen og som ville inkludere naturlige dreperceller, ble samlet inn sammen med 2 x 3 ml vaskebuffer. CD3⁺-cellene ble talt, vasket én gang, deretter farget med CD56-mikrokuler (kat.nr.: 130-050-401, Miltenyi) og separert/isolert ved anvendelse av samme protokollen som for CD3-mikrokuleseparasjonen beskrevet ovenfor. En populasjon CD56+CD3⁺ ble således samlet inn og klar for videre analyse. Prosentandelen naturlige dreperceller var 3,52 til 11,6 (median 6,04, gjennomsnitt 5,22) i HPP og 1,06 til 8,44 i UCB (median: 3,42, gjennomsnitt: 4,2). CD56-mikrokuleutvelging av naturlige dreperceller fra HPP produserte en omtrent 80 % ren populasjon. Se FIG. 1. Blant hele den naturlige CD56⁺, CD3⁺ drepercellepopulasjonen var prosentandelen av CD56⁺, CD16⁺ naturlige dreperceller (dvs. PINK-celler) 56,6 til 87,2 (median 74,2, gjennomsnitt 65,5) fra HPP, og 53,7 til 96,6 (median 72,8) fra UCB. Prosentandelsområdet for CD56⁺, CD16⁺ naturlige dreperceller var 12,8 til 43,3 (median 25,8, gjennomsnitt 34,5) fra HPP, og 3,4 til 46,3 (median 27,3, gjennomsnitt 33,4) for UCB.

[0217] I andre eksperimenter ble naturlige dreperceller isolert ved anvendelse av en magnetisk negativ utvelgingspakke rettet inn mot overflateantigener på humane blodceller (CD3, CD4, CD14, CD19, CD20, CD36, CD66b, CD 123, HLA-DR, glykoforin A). Kryokonserverte HPP- og UCB-enheter ble tint opp og fortynnet ved 1:1 med tiningsmedium (RPMI Media 1640 (katalognr. 22400, Gibco) pluss 20 % varmeinaktivert kalvefosterserum (katalognr. SH30070.03,

Hyclone)) og sentrifugert ved 1500 opm i 8 minutter. Supernatanten ble fjernet og det ble anvendt ammoniumkloridbehandling for videre å fjerne erythrocytter; hver enhet ble suspendert på nytt i omtrent 30 ml av iskald FACS-buffer (RPMI 1640, uten fenolrødt, pluss 5 % FBS) og deretter ble det tilsatt 60 ml iskaldt ammoniumklorid (katalognr. 07850, stamceller), løsningen ble virvlet og deretter inkubert på is i 5 minutter. Mononukleære celler ble deretter vasket med FACS-buffer 3 ganger og deretter sentrifugert ved 1500 opm i 8 minutter. Celleantallet ble telt og cellepelleten ble suspendert på nytt i 5×10^7 levende celler/ml i RoboSep-buffer (katalognr. 20104, stamcelle) pluss 0,1 mg/ml DNAase I-løsning (katalognr. 07900, stamcelle) ble tilsatt cellesuspensjonen, blandet forsiktig med pipette og inkubert i 15 minutter ved romtemperatur før isolering. Klumper ble fjernet fra cellesuspensjonen ved filtrering med 40 μ m masker nylonsil (katalognr. 352340, BD Falcon) før fortsettelse for isolering. Isolering automatiseres av RoboSep-utstyret (katalognr. 20000, stamcelle) og programmet «Human NK Negative Selection 19055 and high recovery» (50 μ l/ml cocktailtilsetning, 100 μ l/ml mikropartikkeltilsetning, 10 og 5 minutters inkuberings, 1 x 2,5 minutt separasjoner) med Human NK Cell Enrichment-pakke (katalognr. 19055, stamcelle) inkludert EasySep Negative Selection Human NK Cell Enrichment-cocktail og EasySep Magnetic-mikropartikler. En populasjon CD56⁺CD3⁻ ble således samlet inn og klar for videre analyse.

[0218] *Ekspansjon av naturlige dreperceller.* Naturlige dreperceller ble generelt ekspandert som følger. Startmedium for kultur for naturlige dreperceller ble tilberedt basert på en modifikasjon av protokollen beskrevet i Yssel et al., J. Immunol. Methods 72(1):219-227 (1984) og Litwin et al., J. Exp. Med. 178(4):1321-1326 (1993). Kort sagt inkluderer startmedium IMDM (Invitrogen) med 10 % FCS (Hyclone), inneholdende de følgende reagensene i endelig konsentrasjon på 35 μ g/ml transferrin (Sigma-Aldrich), 5 μ g/ml insulin (Sigma-Aldrich), 2×10^{-5} M etanolamin (Sigma-Aldrich), 1 μ g/ml oleinsyre (Sigma-Aldrich), 1 μ g/ml linoleinsyre (Sigma-Aldrich), 0,2 μ g/ml palmitinsyre (Sigma-Aldrich), 2,5 μ g/ml BSA (Sigma-Aldrich) og 0,1 μ g/ml fytohemagglutinin (PHA-P, Sigma-Aldrich). CD56⁺CD3⁻ NK-celler ble suspendert på nytt ved $2,5 \times 10^5$ levende celler/ml startmedium pluss 200 iu/ml IL-2 (R&D Systems) i cellekulturbehandlet 24-brønns plate eller T-flaske. Mitomycin C-behandlet allogene PBMC- og K562-celler (kronisk myelogen leukemicellelinje) ble begge tilsatt startmediet som fôrceller til en endelig konsentrasjon på 1×10^6 pr. ml. NK-celler ble dyrket i 5–6 døgn ved 37 °C i 5 % CO₂. Etter 5–6

døgn og deretter hver 3. til 4. døgn ble et likt volum vedlikeholdsmedium (IMDM med 10 % FCS, 2 % human AB-serum, antibiotika, L-glutamin og 400 enheter IL-2 pr. ml) tilsatt kulturen. NK-celler ble høstet på dag 21.

5 **[0219]** *Karakterisering av mellomstadium, placentaderiverte naturlige dreperceller.* Donormatchet HPP og CB ble tint og cellene ble vasket med FACS-buffer (RPMI-1640 med 5 % FBS). Naturlige dreperceller ble deretter anriket med CD56-mikrokuler ved anvendelse av ROBOSEP® magnetiske separasjonssystem (StemCell Technologies) ifølge instruksene fra produsenten.

10 Den CD56-anrikede populasjonen naturlige dreperceller ble farget med de følgende antistoffene (BD Bioscience hvis ikke annet er angitt) for immunfenotypekarakterisering: anti-CD56 konjugert til PE-Cy-7, anti-CD3 APC Cy7, anti-CD16 FITC, anti-NKG2D APC, anti-NKp46 APC, anti-CD94 PE(R&D), anti-NKB1 PE og anti-KIR-NKAT2 PE. CD94, NKG2D og NKp46 er uten markører,

15 eller viser redusert ekspresjon i NK-celleprogenitorer, men forekommer på fullstendig differensierte NK-celler. Se 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, offentliggjort på Internett 3. august

20 2007; Walzer et al., «Natural Killer Cells: From CD3-NKp46+ to Post-Genomics Meta-Analyses,» Curr. Opinion Immunol. 19:365-372 (2007). Som vist i tabell 1 var ekspresjon av KIR3DL1, KIR2DL2/L3, NKG2D, NKp46 og CD94 ikke signifikant forskjellig mellom en anriket CD56⁺ cellepopulasjon fra HPP og en HLA-matchet CD56⁺ cellepopulasjon fra navlestrengblod (CB).

25

Tabell 1. Prosentandel NK-celler med bestemte markørkombinasjoner. Gjennomsnitt av 3 prøver.

	Gjennomsnitt (%)		
	CB	HPP	p-verdi
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

	Gjennomsnitt (%)		
	CB	HPP	p-verdi
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. Eksempel 2: Karakterisering av placentaderiverte intermediære naturlige dreperceller fra placentaperfusat og navlestrengblod

5 **[0220]** Donormatchedede mononukleære celler fra navlestrengblod og
 placentaperfusat (kombo) ble blandet og vasket med FACS-buffer (RPMI-1640
 med 5 % FBS) én gang og immunfenotypisk karakterisert ved anvendelse av
 antistoffene listet i tabell 2 på en BD FACSCanto (BD Biosciences). Dataene ble
 10 analyser med FlowJo-programvare (Tree Star). Tabell 2: Liste over antistoffer
 anvendt i immunfenotypisk karakterisering.

Artikkel	leverandør	Kat.nr.
FITC anti-hu CD3	BD Bioscience	555332
FITC anti-hu CD3	Miltenyi	130-080-401
APC-Cy7 anti-hu CD3	BD Bioscience	557832
FITC anti-hu CD16	BD Bioscience	555406
PE-Cy5 anti-hu CD16	BD Bioscience	555408
PE anti-hu CD56	BD Bioscience	555516
PE anti-hu CD56	Miltenyi	130-090-755
PE-CY5 anti-hu CD56	BD Bioscience	555517
PE-Cy7 anti-hu CD56	BD Bioscience	557747

Artikkel	leverandør	Kat.nr.
PE anti-hu CD94	R&D	FAB-1058P
PE anti-hu KIR-NKAT2 (2DL2/L3)	BD Bioscience	556071
PE anit-hu NKB1 (3DL1)	BD Bioscience	555967
APC anit-hu NKG2D	BD Bioscience	558071
APC anit-hu NKp46	BD Bioscience	558051
PE anti-hu CD226	BD Bioscience	559789
PE anit-hu NKp44	BD Bioscience	558563
PE anti-hu NKp30	BD Bioscience	558407
PE anti-hu 2B4	BD Bioscience	550816
Isotype FITC mus IgG1	BD Bioscience	340755
Isotype FITC mus IgG2b	BD Bioscience	556577
Isotype PE mus IgG1	BD Bioscience	340761
Isotype PE mus IgG2b	BD Bioscience	555743
Isotype PerCP mus IgG1	BD Bioscience	340762
Isotype PE-Cy5 mus IgG2b	BD Bioscience	555744
Isotype APC mus IgG1	BD Bioscience	340754
Isotype APC mus IgG2a	BD Bioscience	555576
Isotype APC-Cy7 mus IgG1	BD Bioscience	348802
Isotype PE-Cy7 mus IgG1	BD Bioscience	348798

[0221] *Immunfenotypkarakterisering av placenta NK-celler og NK-celler fra perifert blod (PB).* NK-celler kan deles inn i to hovedgrupper: CD56⁺CD16⁺ NK-celler og CD56⁺CD16⁻-celler. CD56⁺CD16⁺ NK-celler har rikelig med

cytolyttkorn og høy ekspresjon av CD16, og har derfor kapasitet til å fremkalle antistoffavhengig cellemediert cytotoksitet (ADCC). CD56⁺CD16⁻ NK-celler har derimot svært få cytolyttkorn, lav eller ingen ekspresjon av CD16, men har kapasitet for produksjon av cytokiner og kjemokiner ved aktivering. Individuelle NK-celler viser et bredt repertoar av aktiverende og inhiberende reseptorer, inkludert dreper-immunoglobulin-lignende reseptorer (KIR-er, *f.eks.* KIR3DL1 og KIR2DL2/3), naturlige cytotoksiske reseptorer NCR-er (*f.eks.* NKp30, NKp44 og NKp46), drepercelle lektin-lignende reseptorer (KLR-er; *f.eks.* CD94, NKG2D), 2B4 og CD226.

[0222] FACS-analyse ble utført på NK-celler fra placenta og NK-celler fra perifert blod ved anvendelse av fluorescenskonjugerte mAbs mot spesifikke NK-reseptorer. Blant 11 karakteriserte NK-undersett viste antallet celler i sju av 11 NK-undersett (CD3⁻CD56⁺CD16⁻, CD3⁻CD56⁺CD16⁺, CD3-CD56⁺KIR2DL2/3⁺, CD3-CD56⁺T1Kp46⁺, CD3-CD56⁺NKp30⁺, CD3⁻CD56⁺2B4⁺ og CD3⁻CD56⁺CD94⁺) signifikant forskjell ($p < 0,05$) mellom NK-celler fra placenta og NK-celler fra perifert blod (utgjorde 64 % forskjell) (tabell 3A; se også tabell 3B og 3C).

[0223] Tabell 3A. Fenotypekarakterisering av CD3⁻CD56⁺ NK-celler i 16 enheter kombinert donormatchet navlestrengblod og humant placentaperfusat (kombo) og 13 enheter perifert blod (PB). To-prøve t-testene anvendes for å bestemme om populasjonsgjennomsnittene er like i placentaenheter og enheter fra perifert blod.

	Kombo (16 enheter)	PB (13 enheter)	
Overflatemarkører	Gjennomsnitt %	Gjennomsnitt %	P-verdi
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

	Kombo (16 enheter)	PB (13 enheter)	
Overflatemarkører	Gjennomsnitt %	Gjennomsnitt %	P-verdi
CD3-CD66+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+284	11,1	4,5	0,019
CD3-CD56+CD94	71,3	26,2	0,000

[0224] Tabell 3B og 3C viser fenotypekarakterisering av CD3⁺CD56⁺CD16⁻ og CD3⁺ CD56⁺CD16⁺NK-celler i 16 enheter kombinert donormatchet navlestrengblod og humant placentaperfusat (kombo) og 13 enheter perifert blod (PB) i et separat eksperiment.

5

Tabell 3B.

	Kombo	PB	
Overflatemarkører	Gjennomsnitt %	Gjennomsnitt %	P-verdi
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

86

	Kombo	PB	
Overflatemarkører	Gjennomsnitt %	Gjennomsnitt %	P-verdi
CD3-CD56+CD16-NKp30	46,7	22,0	0,000
CD3-CD56+CD16-2B4	3,7	0,5	0,078

Tabell 3C.

	Kombo	PB	
Overflatemarkører	Gjennomsnitt %	Gjennomsnitt %	P-verdi
CD3-CD56+CD16+	37,7	85,9	0,000
CD3-CD56+CD16+KIR3DL1	21,5	8,9	0,014
CD3-CD56+CD16+NKG2D	42,1	28,5	0,066
CD3-CD56+CD16+KIR2DL2/L3	34,5	12,1	0,000
CD3-CD56+CD16+NKp46	10,4	14,5	0,242
CD3-CD56+CD16+CD94	72,9	23,8	0,000
CD3-CD56+CD16+CD226	35,5	32,6	0,347
CD3-CD56+CD16+NKp44	22,6	6,4	0,016
CD3-CD56+CD16+NKp30	45,7	19,7	0,000
CD3-CD56+CD16+2B4	31,2	6,1	0,008

[0225] 60,9 % NK-celler fra placenta er CD56⁺CD16⁻ (placentaderiverte intermedieære naturlige dreper (PINK)-celler), mens kun 21,4 % NKL-celler fra perifert blod er CD56⁺CD16⁻. Etter dyrking i 21 døgn viste prosentandelen av fire av 11 NK-undersett (CD3⁻CD56⁺KIR2DL2/3⁺, CD3⁻CD56⁺NKp46⁺, CD3⁻CD56⁺NKp44⁺ og CD3⁻CD56⁺NKp30⁺) signifikant forskjell (p < 0,05) mellom NK-celler fra placenta og perifert blod (tabell 4).

[0226] Tabell 4. Fenotypekarakterisering av NK-celler dyrket i 21 døgn, avledet fra 12 enheter kombinert donormatchet navlestrengblod og humant placentaperfusat (kombo) og 9 enheter perifert blod (PB). To-prøve t-testene anvendes for å bestemme om populasjonsgjennomsnittene er like i komboenheter og enheter fra perifert blod.

	Kombo (16 enheter)	PB (13 enheter)	
Overflatemarkører	Gjennomsnitt %	Gjennomsnitt %	P-verdi
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

[0227] I et separat eksperiment ble det i tillegg fastslått at NK-celler, fra placenta og perifert blod etter dyrking i 21 dager viste unike cytokinprofiler, særlig for IL-8, som fastslått ved Luminex-analyse (tabell 5).

Tabell 5

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

[0228] MikroRNA-profilering av NK-celler fra placenta og NK-celler fra perifert blod. Isolerte eller ekspanderte NK-celler ble utsatt for mikroRNA (miRNA)-preparering ved anvendelse av MIRVANA™ miRNA-isoleringspakke (Ambion, kat.nr. 1560). NK-celler ($0,5$ til $1,5 \times 10^6$ celler) ble oppsplittet i en denatureringslysebuffer. Prøvene ble deretter utsatt for syre-fenol+kloroform-ekstraksjon for å isolere RNA svært anriket for små RNA-arter. 100 % etanol ble tilsatt for å bringe prøvene til 25 % etanol. Når dette lysatet / denne etanolblandingen ble passert gjennom et glassfiberfilter, ble store RNA-er immobilisert og de små RNA-artene ble samlet opp i filtratet. Etanolkonsentrasjonen i filtratet ble deretter økt til 55 % og blandingen ble passert gjennom et andre glassfiberfilter hvor de små RNA-ene ble immobilisert. Dette RNA-et ble vasket noen ganger og eluert i en løsning med lav ionestyrke. Konsentrasjonen og renheten for gjenvunnet RNA ble fastslått ved måling av dets absorbering ved 260 og 280 nm.

[0229] miRNA-er som ble funnet å være unike for PINK-celler vises i tabell 6. Ett miRNA, betegnet hsa-miR-199b, ble funnet å være unikt for NK-celler fra perifert blod. Tabell 6. miRNA-profilering for PINK-celler og PB NK-celler via qRT-PCR.

miRNA-ID	Sanger tilgangsnr.	Sekvens
hsa-miR-100	MIMAT0000098	aaccguagauccgaacuugug
hsa-miR-127	MIMAT0000446	ucggauccgucugagcuuggcu
hsa-miR-211	MIMAT0000268	uucccuuugucauccuucgccu

miRNA-ID	Sanger tilgangsnr.	Sekvens
hsa-miR-302c	MIMAT0000717	uaagugcuuccauguuucagugg
hsa-miR-326	MIMAT0000756	ccucuggggcccuuccuccag
hsa-miR-337	MIMAT0000754	uccagcuccuauaugaugccuuu
hsa-miR-497	MIMAT0002820	cagcagcacacugugguuugu
hsa-miR-512-3p	MIMAT0002823	aagugcugucauagcugagguc
hsa-miR-515-5p	MIMAT0002826	uucuccaaaagaaagcacuuucug
hsa-miR-517b	MIMAT0002857	ucgugcauccuuuagaguguu
hsa-miR-517c	MIMAT0002866	aucgugcauccuuuagagugu
hsa-miR-518a	MIMAT0002863	aaagcgcuucccuuugcugga
hsa-miR-518e	MIMAT0002861	aaagcgcuucccuucagagug
hsa-miR-519d	MIMAT0002853	caaagugccuccuuuagagug
hsa-miR-520g	MIMAT0002858	acaaagugcuucccuuagagugu
hsa-miR-520h	MIMAT0002867	acaaagugcuucccuuagagu
hsa-miR-564	MIMAT0003228	aggcacggugucagcaggc
hsa-miR-566	MIMAT0003230	gggcgccugugaucccaac
hsa-miR-618	M1MAT0003287	aaacucuacuuguccuucugagu
hsa-miR-99a	MIMAT0000097	aacccguagauccgaucuugug

[0230] *Immunfenotypekarakterisering av dyrkede NK-celler fra placenta og NK-celler som ikke har vært dyrket.* De generelle egenskapene ved dyrkede PINK-celler ble evaluert ved omfattende immunfenotypestudier og cytotoxistetsanalyser. For å fastslå fenotypen for ekspanderte NK-celler, ble ekspresjon av NK-reseptorer (NKR-er), slik som KIRs, NKG2D, NKp46, NKp44 og 2B4 analysert. Cytotoxistetsanalyser ble utført ved merking av tumorceller

(K562-celler) med PKH26, deretter dyrking sammen med PINK-celler i 4 timer. Fra dag 0 til dag 21 økte uttrykkningen av NKG2D fra 60,9 % $\pm$ 4,8 % til 86 % $\pm$ 17,4 % (p-verdi på 0,024); NKp46 økte fra 10,0 % $\pm$ 5,4 % til 82,8 % $\pm$ 9,0 % (p-verdi på 0,00002); NKp44 økte fra 9,6 % $\pm$ 6,5 % til 51,6 % $\pm$ 27,5 % (p-verdi på 0,022); og 2B4 sank fra 13,0 % $\pm$ 7,1 % til 0,65 % $\pm$ 0,5 % (p-verdi på 0,009 %) (tabell 7). Under disse dyrkingsbetingelsene forble inhiberende KIRs, inkludert KIR3DL1 (drepercelle immunglobulin-lignende reseptor, tre domener, lang cytoplasmahale 1, en inhibitorreseptor) og KIR2DL2/L3 (drepercelle immunglobulin-lignende reseptor, to domener, lang cytoplasmahale 2 og lang cytoplasmahale 3; inhibitorreseptorer) upåvirket i løpet av 21 døgns ekspansjon. Endringene i ekspresjons-NKRs ble videre korrelert med en markert økning i cytolyttaktivitet ved dag 21 mot dag 14 mot K562-celler (63 % $\pm$ 15 % mot 45 % $\pm$ 4 %, p-verdi på 0,0004). Disse funnene har ført til identifiseringen av de antatte markørene for NK-celler som korrelerer svært godt med NK-cellens cytotoksiske aktivitet.

Tabell 7. Fenotypekarakterisering av PINK-celler før og etter 21 døgns dyrking. Standardavvik (Stdev) ble beregnet for populasjongjennomsnitt for 5 donorer.

	Dag 0		Dag 21	
	Gjennomsnitt %	Stdev	Gjennomsnitt %	Stdev
CD3-CD56+	2,9	1,1	85,5	8,6
CD3-CD56+CD16-	62,6	20,2	27,8	8,3
CD3-CD56+CD16+	37,4	20,2	72,2	8,3
CD3-CD56+KIR3DL1+	22,7	4,2	20,0	16,7
CD3-CD56+KIR2DL2/L3+	28,4	4,2	29,6	6,4
CD3-CD56+NKG2D+	60,9	4,8	86,0	17,4
CD3-CD56+NKp46+	10,5	5,4	82,8	8,9
CD3-CD56+CD226+	19,5	7,4	14,1	13,3
CD3-CD56+NKp44+	9,6	6,5	51,6	27,5

	Dag 0		Dag 21	
	Gjennomsnitt %	Stdev	Gjennomsnitt %	Stdev
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

[0231] *Membranproteomisk profilering av dyrkede NK-celler fra placenta og dyrkede NK-celler fra perifert blod via lipidbasert proteinimmobiliseringsteknologi og lineær ionefelle-LC/MS. Membranproteinrensing:* Naturlige dreperceller fra placenta fra kombinert placentaperfusat og navlestrengblodceller, og PN NK-celler dyrket i 21 døgn ble inkubert i 15 min. med en cocktailløsning av proteaseinhibitor (P8340, Sigma Aldrich, St. Louis, MO; inneholder 4-(2-aminoetyl)benzenesulfonylfluorid (AEBSF), pepstatin A, E-64, bestatin, leupeptin og aprotinin, uten metallchelatorer) før cellelysering. Cellene ble deretter lysert ved tilsetning av en 10 mM HCl-løsning, uten rengjøringsmiddel og sentrifugert i 10 min ved 400 g for å pelletere og fjerne kjernen. Den post-nukleære supernatanten ble overført til et ultrasentrifugeringsrør og sentrifugert på en WX80 ultrasentrifuge med T-1270-rotor (Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC) ved 100 000 g i 150 minutter for generering av en membranproteinpellet.

[0232] Generering, immobilisering og fordøyelse av proteoliposomer: Membranproteinpelleten ble vasket flere ganger ved anvendelse av NANOXIS®-buffer (10 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8). Membranproteinpelleten ble suspendert i 1,5 ml NANOXIS®-buffer og deretter spiss-sonikert ved anvendelse av en VIBRA-CELL™ VC505 ultralydprosessor (Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT) i 20 minutter på is. Størrelsen på proteoliposomene ble fastsatt ved farging med FM1-43-farge (Invitrogen, Carlsbad, CA) og visualisering med fluoriseringsmikroskopi. Proteinkonsentrasjonen av proteoliposomsuspensjonen ble fastsatt med en BCA-analyse (Thermo Scientific). Proteoliposomene ble deretter injisert på en LPI™-strømningscelle (Nanoxis AB, Gøteborg, Sverige) ved anvendelse av en standard pipettespiss, og fikk immobilisere i 1 time. Etter immobilisering ble en rekke vasketrinn gjennomført og trypsin ved 5 µg/ml (Princeton Separations, Adelphi, NJ) ble injisert direkte på LPI™-strømningscellen. Brikken ble inkubert over natten ved

37 °C. Tryptiske peptider ble deretter eluert fra brikken og deretter avsaltet ved anvendelse av en Sep-Pak-patron (Waters Corporation, Milford, MA).

[0233] Kraftig kationutvekslings (SCX)-fraksjonering: Tryptiske peptider ble rekonstituert i en 0,1 % mausyre-/vannløsning og lastet på en kraftig kationutvekslings (SCX) TOP-TIP™-kolonne (PolyLC, Columbia, MD), en pipettespiss pakket med 30 µm polysufoetylaspartamid SCX-pakkingsmateriale. Peptidene ble eluert fra SCX TOP-TIP™ ved anvendelse av en trinn-gradient med ammoniumfosfatbuffer, pH 2,8 (10 mM–500 mM). Hver SCX-fraksjon ble tørket ved anvendelse av et hurtigvakuumsystem og rekonstituert med 5 % acetonitril, 0,1 % maursyre i forberedelse av nedstrøms LC/MS-analyse.

[0234] LTO-lineær ionefelle LC/MS/MS-analyse: Hver SCX-fraksjon ble separert på en 0,2 mm x 150 mm 3 µm 200 Å MAGIC C18-kolonne (Michrom Bioresources, Inc., Auburn, CA) som var koblet direkte til en aksialavoppløsnings vakuumassistert nanokapillær elektroprayonisering (ADVANCE)-kilde (Michrom Bioresources, Inc.) ved anvendelse av en 180 min. gradient (buffer A: Vann, 0,1 % maursyre: Buffer B: Acetonitril, 0,1 % maursyre). ADVANCE-kilden oppnår en sensitivitet som er sammenlignbar med tradisjonell nanoESI, selv om den fungerer ved en betydelig høyere strømningshastighet på 3 µl/min. Eluerte peptider ble analysert på et TQ lineært ionefellemassespektrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) som tok i bruk ti dataavhengige MS/MS-skanninger etter hvert fullskann-massespektrum.

[0235] Bioinformatikk: Seks RAW-filer tilsvarende de 6 saltfraksjonene som ble samlet inn for hver tumorcellelinje (AML, CML) ble søkt som et enkelt søk mot IPI Human Database ved anvendelse av implementering av SEQUEST-algoritmen på en SORCERER™ SOLO™ arbeidsstasjon (Sage-N Research, San Jose, CA). Det ble spesifisert en peptidmassetoleranse på 1,2 amu, oksidering av metionin ble spesifisert som en differensialmodifisering og karabmidometylering ble spesifisert som en statisk modifisering. En strukturprogramvareimplementering av trans-proteomisk rørline (TPP) ble anvendt for å sortere og parse membranproteindataene. Proteiner ble vurdert for analyse hvis identifisert med en peptidsannsynlighet på 95 %, proteinsannsynlighet på 95 % og 1 unikt peptid. Sammenligning mellom membranproteomdatasett ble laget ved anvendelse av tilpasset Perl-skript som ble utviklet på stedet.

[0236] Analysen avslørte identifiseringen av 8 membranproteiner fra dyrkede NK-celler fra placenta som var unik med hensyn til membranproteiner identifisert fra NK-celler fra perifert blod. Se tabell 8. 8 membranproteiner ble videre identifisert fra NK-celler fra perifert blod som var unike med hensyn på dyrkede NK-celler fra placenta. Se.

[0237] Tabell 8. Kun 10 identifiserte membranproteiner ble funnet å være delt mellom både dyrkede NK-celler fra placenta og NK-celler fra perifert blod.

Tabell 8.

PROTEINER SPESIFIKKE FOR NK-CELLER FRA PLACENTA	PROTEINER SPESIFIKKE FOR NK-CELLER FRA PB
Aminopeptidase N	Fibroblast vekstfaktorreseptor 4-prekursor
Apolipoprotein E	Immunitetsforbundet nukleotid 4-lignende 1 protein
Atrofin-1 interaksjonsprotein 1	Integrin alpha-L-prekursor
Innexin inx-3	Integrin beta-2-prekursor
Integrin alfa-2-prekursor	Integrin beta-4-prekursor
Integrin beta-5-prekursor	Membranbundet lytisk murin transglykosylase D-prekursor
Mascelleoverflateglykoprotein GP49B-prekursor	Oksysterolbindene proteinrelater protein 8
Ryanodin-reseptor 1	Perforin 1-prekursor

6.3. Eksempel 3: Naturlig dreperceller-cytotoksistet mot tumorceller

[0238] Dette eksemplet demonstrerer at intermediaære naturlige dreperceller fra placenta er cytotoksiske mot tumorceller. PINK-celler fra HPP er cytotoksiske mot akutt myelogen leukemi-celler, som demonstrert i en cytotoksistetsanalyse og ved Luminex-analyse av cytokinsekresjon fra NK-celler.

[0239] I cytokinsekresjonsanalysen ble CD56-mikrokuleanrikede NK-celler fra HPP blandet med KG-1a akutt myelogen leukemi-celler i et forhold på 1:1. Etter inkubasjon i 24 timer ble supernatanten samlet inn og utsatt for Luminex-analyse av IFN- γ - og GM-CSF-sekresjon. Det ble observert økte nivåer av IFN- γ og GM-CSF etter 24 timers inkubasjon av CD56-anrikede HPP-celler med KG-1a-celler som vist i FIG. 2.

Cytotoksiske PINK-celler

[0240] I en cytotoxitsanalyse som benyttet PINK-celler, ble måltumorceller merket med karboksyfluorosceinsukkinimidylester (CFSE). CFSE er en avgjørende farge som er ikke-toksisk for celler og fordeles mellom datterceller under celledeling. Cellene ble deretter plassert i 96-brønns U-formede vevsdyrkingsplater og inkubert med nylig isolerte CD56⁺CD16⁻ PINK-celler i effektor-mål (E:T)-forhold på 20:1, 10:1, 5:1 og 1:1 i RPMI 1640 supplert med 10 % FBS. Etter 4 timers inkubasjonstid ble cellene høstet og undersøkt ved strømningscytometri i nærvær av CFSE. Antallet målceller gjenvunnet fra kulturen uten NK-celler ble anvendt som referanse. Cytotoksitet defineres som: $(1 - \text{CFSE}_{\text{prøve}} / \text{CFSE}_{\text{kontroll}}) * 100 \%$. Signifikant tumorcellecytotoksitet ble observert ved forholdet 20:1. Se FIG. 3.

[0241] *Tumorcellesusceptibilitet for dyrket PINK-cellelaktatdehydrogenase (LDH)-frissettingsanalyse.* LDH-frissettingsanalysen ble utført ved anvendelse av CYTOTOX 96® kalorimetricytotoxitsitetsanalysesett (Promega, kat.nr. G1780). I denne analysen var dyrkede NK-celler, omfattende en kombinasjon av CD56⁺CD16⁻-celler og CD56⁺CD16⁺-celler, avledet fra matchet HPP/UCB effektorceller, og tumorceller var målceller. Effektorceller og målceller ble plassert i 96-brønns vevsdyrkingsplater med U-bunn og inkubert ved forskjellige effektor-mål (E:T)-forhold i 100 μ l RPMI 1640 uten fenolrødt (Invitrogen, kat.nr. 11835-030) supplert med 2 % humant AB-serum (Gemini, kat.nr. 100-512). Kulturer ble inkubert i 4 timer ved 37 °C i 5 % CO₂. Etter inkubasjon ble 50 μ l supernatant overført til enzymatisk analyseplate, LDH-aktivitet ble registrert som angitt av produsenten og absorpsjon ble målt ved 490 nm i en ELISA-leser (Synergy HT, Biotek). Cytotoksitetsgraden ble beregnet ifølge den følgende ligningen: % cytotoxitsitet = $(\text{prøve} - \text{effektor spontan} - \text{mål spontan}) / (\text{mål maksimum} - \text{mål spontan}) * 100$.

5 **[0242]** Visse tumortyper kan være mer responsive for NK-celler enn andre. For å analysere tumorcellers følsomhet for dyrkede PINK-celler ble tolv forskjellige tumorcellelinjer dyrket sammen med PINK-celler analysert i en LDH-frisettingsanalyse. De 12 tumorcellelinjene inkluderte human kronisk myelogen leukemi (CML), lymfom, retinoblastom (RB) og myelomatose (MM) (tabell 9). NK-celle cytotoksisitet ble målt på LDH-frisettingsanalyse etter 4 timers fellesdyrking.

Tabell 9. ATCC-tumorcellelinjer

Navn	Beskrivelse
CCRF-CEM	Human leukemi
KG-1	Human akutt myeloid leukemi
KG-1A	Human akutt myeloid leukemi
K562	Human kronisk myeloid leukemi
KU812	Human kronisk myeloid leukemi
U-937	Humant histiocyttlymfom
WERI-RB-1	Humant retinoblastom
HCC2218	Human brystkreft
RPMI 8226	Human myelomatose
HCT116	Humant kolorektalt karsinom
HT29	Humant kolorektal adenokarsinom
U266	Human myelomatose

10 **[0243]** Ved effektor til mål (E:T)-forhold på 10:1 ble det observert signifikant cytotoksisitet fra dyrkede PINK-celler mot K562-celler (CML) ved 88,6 % ± 5,6 %, U937-celler (lymfom) ved 89,2 % ± 9,8 %, WERI-RB-1-celler (RB) ved 73,3 % ± 11,8 %, RPMI8226 celler (MM) ved 61,3 % ± 1,3 % og U266-celler (MM) ved 57,4 % ± 4,7 % (tabell 10).

Tabell 10. Forskjeller i tumorcellers mottakelighet for dyrkede PINK-celler. Standardfeil for gjennomsnittet (S.E.M.) ble beregnet for gjennomsnittlig cytotoxissitet fra 3 donorer.

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

5 ***Forsterking av PINK-cellecytotoxissitet ved behandling med lenalidomid og pomalidomid***

[0244] *RNA-isolering og -rensing.* Isolerte og ekspanderte NK-celler ble utsatt for RNA-tilberedning ved anvendelse av RNAQUEOUS®-4PCR-pakken (Ambion, kat.nr. AM1914). Kort sagt ble NK-celler ($0,5$ til $1,5 \times 10^6$ celler) lysert i guanidiniumlyseringsløsning. Prøvelysatet ble deretter blandet med en etanolløsning og påført silikabasert filter som selektivt og kvantitativt binder mRNA og de større ribosome RNA; svært små RNA, slik som tRNA og 5S-ribosom RNA, ble ikke kvantitativt bundet. Filteret ble deretter vasket for å fjerne gjenværende DNA, protein og andre kontaminanter, og RNA ble eluert i nukleasefritt vann inneholdende spormengder av EDTA for å chelatere tungmetaller. Silikafilteret ble satt inn i en

liten patron som passer inn i RNase-frie mikrofugerør som følger med pakken. Prøvelysatet, vaskeløsningene og elueringsløsningen ble fjernet gjennom filteret ved sentrifugering eller vakuumtrykk. Etter eluering fra filteret ble RNA-et behandlet med den ultrarene DNase 1 som følger med pakken, for å fjerne spormengder av DNA. DNase og divalente kationer ble endelig fjernet med en reagens som også følger med pakken. Konsentrasjonen og renheten for gjenvunnet RNA ble fastslått ved måling av dets absorpsjon ved 260 og 280 nm.

[0245] *Kvantitativ sanntids (qRT-PCR)-analyse.* Isolerte RNA kan deretter anvendes for cDNA-syntese ved anvendelse av TAQMAN® reverstranskripsjonsreagenser (Applied Biosystems, kat.nr. N8080234) etterfulgt av sanntids PCR-analyse på 7900HT sanntids PCR-hurtigsystem ved anvendelse av human immunnmatrise (Applied Biosystems, kat.nr. 4370573) og human mikroRNA-matrise (Applied Biosystems, kat.nr. 4384792).

[0246] Lenalidomid og pomalidomid er kjemiske analoger av talidomid med forsterkede anti-kreft og anti-inflammatoriske aktiviteter. For å undersøke om lenalidomid og pimalidomid kan forsterke PINK-cellecytotoksisitet ble *ex vivo*-dyrkede (dag 19) PINK-celler forhåndsbehandlet med lenalidomid eller pomalidomid i 24 timer, etterfulgt av fellesdyrking med kolorektalt karsinom-målcellelinje HCT-116. Lenalidomid-behandlede NK-celler viste 42,1 % cytotoxiskitet og pomalidomid-behandlede NK-celler viste 47,4 % cytotoxiskitet, mens ubehandlede PINK-kontrollceller kun viste 24,3 % cytotoxiskitet.

[0247] Kvantitativ sanntids PCR (qRT-PCR) og strømningscytometrianalyser viser at den pomalidomid-utløste forsterkingen av NK-cellecytotoksisitet korrelerte med økt granzym B (GZMB)-genekspresjon (60 % ± 1,7 % økning) (tabell 11) og økt prosentandel av GZMB-positive NK-celler (25 % økning). I tillegg økte ekspresjon av GM-CSF i lenalidomid (232 % ± 1,6 % økning)- og pomalidomid (396 % ± 0,3 % økning)-behandlede PINK-celler (tabell 11A, 11B). Tabell 11 A, 11B. qRT-PCT-analyse av lenalidomid- og pomalidomid-behandlede dyrkede PINK-celler sammenlignet med ubehandlede celler. 11A: Størrelse på endring i genekspresjon mellom lenalidomid-behandlede og lenalidomid-ubehandlede prøver for opplistede gener. Den parete t-testen anvendes for å fastslå om størrelsen i endringen er lik i lenalidomid-behandlede og -ubehandlede prøver. 11B: Størrelse på endring i genekspresjon mellom pomalidomid-behandlede og pomalidomid-ubehandlede prøver for 25

opplistede gener. Den parete t-testen anvendes for å fastslå om størrelsen i endringen er lik i behandlede og ubehandlede prøver.

Tabell 11A

	Veh	Len.	Veh-stdev	Len.-stdev	P-verdi
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 - BCL2-forbundet X-protein CCL5 - kjemokin (C-C-motiv)-ligand 5 CCR5 - kjemokin (C-C-motiv)-reseptor 5 CSF2 - kolonistimulerende faktor 2 (granulocyt-makrofag) FAS - TNF-reseptorsuperfamilie, medlem 6 GUSB - β glukuronidase IL2RA - α -interleukin-2-reseptor TNFRSF18 -tumornekrosefaktorreseptor-superfamilie, medlem 18					

5

Tabell 11B

	Veh	Pom.	Veh-stdev	Pom-stdev	P-verdi
ACTB	1	0,77	0,01	0	0,01

	Veh	Pom.	Veh-stdev	Pom-stdev	P-verdi
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

	Veh	Pom.	Veh-stdev	Pom-stdev	P-verdi
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-aktin BAX - BCL2-forbundet X-protein CCL2 - kjemokin (C-C-motiv)-ligand 2 CCL3 - kjemokin (C-C-motiv)-ligand 3 CCL5 - kjemokin (C-C-motiv)-ligand 5 CCR5 - kjemokin (C-C-motiv)-reseptor 5 CSF1 - kolonistimulerende faktor 1 (makrofag) CSF2 - kolonistimulerende faktor 2 (granulocytt-makrofag) ECE1 - endotelinkonverterende enzym 1 FAS - TNF-reseptorsuperfamilie, medlem 6 GNLY - granulysin GUSB -glukuronidase-β GZMB -granzym B (granzym 2, cytotoxisk T-lymfocytforbundet serinesterase 1) IL1A -α interleukin 1 IL2RA - interleukin-2-reseptor-β IL8 - interleukin 8 IL10 - interleukin 10 LTA - lymfotoksin α (TNF-superfamilie, medlem 1) PRF1 - perforin 1 (poredannelseprotein) PTGS2 - prostaglandin-endoperoksidsyntase-2-(prostaglandin G/H-syntase og syklooksigenase) SKI - v-ski sarkom virusonkogenahomolog (fugl) TBX21 - T-boks 21					

Cytotoksitet for naturlige dreperceller

[0248] I en separat cytotoxissitetsanalyse var dyrkede NK-celler derivert fra donormatchet navlestrengblod og placentaperfusat-effektorceller, mens tumorceller var målceller. Tumorceller ble merket med PKH26 (Sigma-Aldrich katalognr. PKH26-GL) (se *f.eks.* Lee-MacAry et al., J. Immunol. Meth. 252(1-2):83-92 (2001)), som setter seg i celleplasmamembranen på grunn av dens lipofilalifatiske restmengde, deretter plassert i 96-brønns vevsdyrkingsplater med U-bunn og inkubert med dyrkede NK-celler i forskjellige effektor-mål (E:T)-forhold i 200 µl RPMI 1640 supplert med 10 % FBS. Kulturer ble inkubert i 4 timer ved 37 °C i 5 % CO₂. Etter inkubering ble cellene høstet og TO-PRO-3 (Invitrogen, katalognr. T3605), en membran-ugjennomtrengelig DNA-stamme, tilsatt kulturene til en 1 µM sluttkonsentrasjon etterfulgt av FACS-analyse ved anvendelse av BD FACSCanto. Cytotoxissitet ble uttrykt som prosentandel døde celler (PKH26⁺TO-PRO-3⁺) innenfor det totale antallet PKH26⁺ tumormålceller.

[0249] I denne cytotoxissitetsanalysen ble human kronisk myeloid lymfom (CML) K562-celler merket med PKH26, som legger seg i celleplasmamembranen og plassert i 96-brønns vevsdyrkingsplater med U-bunn. NK-celler fra placenta (kombo) eller perifert blod dyrket i 21 døgn ble blandet med K562-celler i effektor til mål (E:T)-forhold på 10:1, 5:1, 2.5:1 og 1,25:1 i RPMI 1640 supplert med 10 % volum/volum FBS. Etter en inkubasjonstid på 4 timer ble cellene høstet og TO-PRO-3 ble tilsatt cellekulturene etterfulgt av strømningscytometri i nærvær av PKH26 og TO-PRO-3. Cytotoxissitet ble uttrykt som prosentandel døde PKH26⁺TO-PRO-3⁺-celler innenfor det totale antallet PKH26⁺ tumormålceller. Både NK-celler fra placenta og NK-celler fra perifert blod viste betydelig toksisitet mot K562-celler ved alle testede E:T-forhold (FIG. 4). Det ble observert signifikant høyere toksisitet for NK-celler fra placenta enn for NK-celler fra perifert blod mot K562-celler ved to E:T-forhold, 10:1 og 5:1 (FIG. 4).

6.4. Eksempel 4: Cytotoxissitet for humant placentaperfusat mot tumorceller

[0250] Dette eksemplet demonstrerer at human placentaperfusatceller er cytotoxiske mot tumorceller og at cytotoksissiteten for fullstendig nukleerte celler fra HPP (TNC-HPP) for KG-1a var høyere enn den for TNC fra matchet UCB. Fullstendig nukleerte celler fra HPP eller navlestrengblod (UCB) ble blandet med KG-1a-celler i forhold på 1:1, 5:1, 10:1, 20:1 eller 100:1. Etter inkubasjon i 24 t eller 48 t ble cellene høstet og undersøkt for forekomst av CFSE med FACS-

analyse (BD FACSCanto, BD Bioscience). Tumorceller dyrket alene ble anvendt som kontroller. Cytotoksisitet ble definert som: $(1 - \text{CFSE}_{\text{prøve}} / \text{CFSE}_{\text{kontroll}}) * 100 \%$. Det ble vist signifikant cytotoksisitet ved forholdet 100:1. Se FIG. 5.

5 **[0251]** I et separat eksperiment ble cytotoksisiteten for fullstendig nukleerte celler fra HPP ble sammenlignet med den for fullstendig nukleerte celler fra navlestrengblod. Matchede TNC-HPP eller UCB ble blandet med KG-1a-celler i forhold på 0,78:1, 1,56:1, 3,12:1, 6,25:1, 12,5:1, 25:1, 50:1 eller 100:1. TNC-HPP viste konsistent høyere cytotoksisitet ved alle forhold sammenlignet med det for UCB. Se FIG. 6.

10 **[0252]** I et annet eksperiment, 24 timer før inkubasjon med KG-1a-celler, ble TNC-HPP stimulert med 100 U/l eller 1000 U/ml av IL-2, mens HPP dyrket med RPMI-medium ble anvendt som kontroll. I et forhold på 6,25 NK-celler pr. KG-1a-celler og over synes IL-2 å øke cytotoksisiteten for TNC-HPP. Se FIG. 7.

15 **[0253]** Eksperimentene ble gjentatt ved anvendelse av et bredt spekter av tumorcelletyper, som vist i tabell 12 ved anvendelse av 5×10^5 HPP-celler og 1×10^4 tumorceller.

20

Tabell 12: Tumorcelletyper testet for cytotoksisk virkning av placentaperfusat

HCC2218	Humant primært ductalt karsinom
CCRF-CEM	Human leukemi
J.RT3-T3.5	Human akutt T-celleleukemi
K562	Humant kronisk myeloid lymfom (CML)
KG-1	Human akutt myelogen leukemi
KG-1a	Human akutt myelogen leukemi (AML)
KU812	Human leukemi (CML)
NCI-H1417	Humant lungekarsinom
SNU-CI	Humant kolonadenokarsinom
U-937	Humant histiocyttlymfom

WERI-RB-1	Humant retinoblastom
HCT-116	Humant kolorektalt karsinom
HT-29	Humant kolorektalt adenokarsinom
U266	Humant myelom

[0254] Når HPP-celler og tumorceller ble dyrket sammen i 24 timer eller 48 timer i et forhold på 50:1, viste HPP-cellene betydelig toksisitet mot tumorcellene. For begge tidsperiodene resulterte fellesdyrkingen i død av mer enn 50 % av tumorcellene. Se FIG. 8A og 8B.

6.5. Eksempel 5: Cytokinproduksjon av humane placentaperfusatceller under eksponering for tumorceller

[0255] For å fastsette den primære virkningsmekanismen som er ansvarlig for mediering av de potente anti-leukemivirkningene av HPP-celler, ble cytokinfrisettingsprofilen for HPP-celler dyrket sammen med tumorcellelinjer analysert og sammenlignet med den for UCB-celler på forskjellige tidspunkt med multiplekset Luminex-analyse.

[0256] Supernatanter samlet inn etter inkubasjon ble underkastet Luminex-analyse for å fastsette konsentrasjonene av IFN- γ , TNF- α og GM-CSF (kat.nr. HCYTO-60K-03, Millipore). Disse tre cytokinene er forbundet med NK-cytoksisitet. (Se f.eks. Imai et al., Blood 2005. 106(1):376-83.). Det ble også utført kvantitativt RT-PCR for å undersøke ekspresjonen av IFN- γ , TNF- α og GM-CSF ved anvendelse av Applied Biosystems FAST 7900HT-instrument og -primere. Dyrkingsbetingelsene var de samme som for de fellesdyrkede cytotoxissitetsanalysene beskrevet ovenfor. Cytonikonsentrasjoner ble fastsatt ved anvendelse av en Luminex-analyse.

[0257] Sekresjon av IFN- γ , TNF- α og GM-CSF fra HPP-celler dyrket sammen med tumorceller ble fastslått å være signifikant høyere enn den for UCB-celler. I ett eksperiment ble HPP-celler blandet med KG-1a-celler i forhold på 0,78:1, 1,56:1, 3,12:1, 6,25:1, 12,5:1, 25:1, 50:1 eller 100:1 i nærvær eller fravær av 100 U IL-2. TNC-HPP viste konsistent økt produksjon av IFN- γ i nærvær av IL-2 sammenlignet med fravær av IL-2. IFN- γ -nivåer ved 24 t ble fastslått å øke omtrent 5–26 ganger

(median: 16 ganger); ved 48 t omtrent 3~65 ganger (median: 27 ganger), som var konsistent med resultatene fra cytotoxissitesstudien. Se FIG. 9.

[0258] I et annet eksperiment, 24 timer før inkubasjon med KG-1a-celler, ble TNC-HPP stimulert med 100 U/l eller 1000 U/ml av IL-2, mens HPP dyrket med RPMI-medium ble anvendt som kontroll. HPP- eller matchede UCB-celler ble inkubert i 24 t med eller uten IL-2, før fellesdyrking med KG-1a-celler. Sekresjonen av IFN- γ økte mest i HPP-celler dyrket sammen med K562 og KG-1a ved 48 t. Når HPP-celler ble behandlet med 100 U/ml IL-2, økte cytotoxissiteten av HPP-celler på KG-1a ved 24 t og 48 t. Sekresjonsnivået for IFN- γ i HPP-celler var høyere enn det for matchede UCB-celler ved IL-2-behandling. Høyere ekspresjon av IFN- γ ble bekreftet ved RT-PCR-analyse av celler fra matchet HPP og UCB. Disse resultatene viser at HPP-celler utviser høyere anti-leukemiaktivitet sammenlignet med UCB-celler, og at denne høyere aktiviteten er forbundet med en signifikant økning i IFN- γ -produksjon.

[0259] IFN- γ -produksjon i HPP-celler og i navlestrengblodceller, under fellesdyrking med panel av tumorceller ble analysert ved anvendelse av tumorcellelinjene listet i tabell 1 ovenfor. HPP-celler og tumorceller ble dyrket sammen i 24 timer eller 48 timer i et forhold på 50:1 ved anvendelse av 10^4 tumorceller og 5×10^5 HPP-celler. For cellelinjene CCRF-CEM, J.RT3-T3.5, K562, KG1, KG-1a, KU812, NC1-H1417, U-937 og WER1-RB-1 oversteg økning i IFN- γ -produksjon i HP-celler ved 24 timers fellesdyrking den for navlestrengblodceller dyrket like lenge sammen med disse cellelinjene. Se FIG. 10A. Ved 48 timers dyrking oversteg økningen i IFN- γ -produksjon i HPP-celler den for navlestrengblod for alle tumorcellelinjer. Se FIG. 10B. Av tumorcellelinjene induserte K562-celler den største økningen i IFN- γ -produksjon i HPP-celler ved både 24 timer og 48 timer. Lignende resultater ble observert for TNF- α og GM-CSF.

[0260] Cellesyklusanalyse demonstrerte at prosentandelen KG-1a i S-fase sank med 30 % når dyrket sammen med HPP, sammenlignet med KG-1a-celler dyrket alene. Videre fellesdyrkingseksperimenter utført ved anvendelse av forskjellig anrikede fraksjoner av HPP demonstrerte at anti-leukemiaktiviteten av HPP hovedsakelig kunne tilskrives den høye konsentrasjonen av unike, umodne naturlige dreperceller karakterisert ved høy ekspresjon av CD56⁺, mangel på ekspresjon av CD16.

6.6. Eksempel 6: Undertrykking av tumorcelleproliferasjon *in vivo* ved humane placentaperfusatceller

6.6.1. Materialer og fremgangsmåter

5

[0261] Dette eksemplet demonstrerer effektiviteten av humant placentaperfusat *in vivo* mot tumorceller ved anvendelse av NOD/SCID xenotransplantat-tumormodell i mus.

10

[0262] *Dyrking av KG-1-celler.* KG-1-celler ble vedlikeholdt i Iscoves modifiserte Dulbeccos-medium supplert med 20 % kalvefosterserum (vekstmedium) ved 37 °C i 95 % luft/5 % CO₂ og 100 % luftfuktighet. Medium i kulturen ble skiftet ut annenhver dag og cellene ble passert ukentlig. KG-1-celler vokser som suspensjoner. For utskifting av medium eller passasje av

15

celler ble derfor cellesuspensjonene samlet inn i sentrifugeringsrør og sentrifugert ved 2000 opm i 10 min. i en SORVALL® HERAEUS®-rotor (delenr. 75006434). Supernatanten ble kastet og en egnet mengde av cellepelletten ble suspendert på nytt i vekstmedium for videre dyrking.

20

[0263] *KG-1-cellepreparat for implantering.* For celleimplantering hos mus ble cellene høstet ved sentrifugering som beskrevet ovenfor. Cellepelletter ble samlet inn og suspendert på nytt i fosfatbufret saltløsning. For å fastsette antallet celler for implantering hos musen, ble en alikvot av cellesuspensjonen telt opp ved anvendelse av et hemacyttometer. Trypanblå farge ble anvendt for

25

å ekskludere ikke-levedyktige celler i suspensjonen.

[0264] *HPP-cellepreparat for implantering.* For HPP-lagring og -tining ble prøver mottatt frosne i en tørrforsendelsesbeholder i god stand. Enhetene ble oppbevart i tørrforsendelsesbeholderen inntil opptining den 7. februar 2007. På opptiningsdagen ble HPP-enheter fjernet fra kryofryseren (én om gangen) og plassert i plastposer med glidelås. Posene ble deretter plassert i et 37 °C vannbad med forsiktig agitering inntil nesten tint (et lite frossent stykke igjen i posen). Posene ble deretter fjernet fra vannbadet, enhetene ble fjernet fra glidelåsposene og enhetene ble forsiktig invertert inntil fullstendig tint. Enhetene ble deretter plassert i en laminert strømningshette, og den ytre overflaten av blodposen ble sterilisert ved spraying med 70 % etanol. Blodposene ble klippet åpne med steril saks, og cellene ble overført til sterile 50 ml koniske rør (1 rør for hver HPP-enhet; 2 rør for hver UBC-

30

35

enhet) med steril pipette. Deretter ble 10 ml tiningsbuffer (2,5 % humant albumin, 5 % dekstran 40) sakte tilsatt hvert rør ved forsiktig agitering (over en periode på 2,2–2,9 minutter). Hver blodpose ble deretter skylt med 10 ml tiningsbuffer, som deretter ble sakte tilsatt det koniske 50 ml røret (over en periode på 0,7–1,3 min).

5

[0265] Etter tining ble hver enhet oppbevart på våt is før sentrifugering. Alle rørene ble sentrifugert i 10 min (440 x g ved 10 °C), supernatantene ble aspirert ved anvendelse av sterile pipetter og pelletene ble forsiktig oppsplittet ved risting av røret. A 1 ml alikvot av bæremiddel (PBS + 1 % kalvefosterserum) ble tilsatt ett av rørene, og røret ble blandet med forsiktig omdreining. Ved anvendelse av en 2 ml pipette ble innholdet overført til et andre rør, deretter til et tredje rør og deretter til et fjerde rør. De tomme rørene ble vasket med 0,2 ml fortynningsbuffer.

10

[0266] For celleopptelling ble en 25 µl alikvot overført til et 15 ml konusformet rør inneholdende 975 µl bæremiddel på is. Erytrocytter ble deretter lysert ved tilsetning av 4 ml kald ammoniumklorid lyseringsreagens og inkubert på is i 10 min. Etter inkubasjon ble 5 ml kald PBS tilsatt hvert rør, og rørene ble sentrifugert (10 min., 400 x g, 10 °C). Etter RBC-lysering ble cellene telt på hemacyttometer ved anvendelse av trypanblått for å vurdere levedyktighet. Opptellingsresultatene ble korrigert for fortynning og deretter delt etter en lyseringsfaktor (0,46) for å estimere antallet forekommende celler før RBC-lysering.

15

20

[0267] For HPP-dosetilberedning ble HPP-celler fortynnet etter opptelling til 1×10^8 celler/ml ved tilsetning av bæremiddel. HPP-celler ble deretter oppbevart på is inntil lasting av sprøytene. Det gikk mindre enn 3 timer mellom tining av den første enheten og fullføring av dosetilberedningen.

25

[0268] Før fylling av sprøytene ble en 50 µl alikvot av doseringsmaterialet satt tilside for post-dose-bekreftelse ved opptelling som beskrevet ovenfor. Etter dosering ble det gjenværende doseringsmaterialet vurdert for dosebekreftelse.

30

[0269] *Studiedesign.* På dag 1 ble tjuefire NOD/SCID hannmus (Jackson Laboratories) implantert med 5 millioner levedyktige KG-1-celler S/C i flankeregionen. Musene ble skilt slik at fire til fem mus oppholdt seg i et mikro-isoleringsbursystem med sagflisdekke. Sterilisert gnagerfôr og vann ble gjort tilgjengelig *ad libitum*. Musene ble nøye undersøkt for tumorvekst to ganger i uken. Den første målbare tumoren ble observert på dag 25. Kroppsvekten ble

35

deretter registrert én gang i uken og tumormålinger registrert to ganger i uken ved anvendelse av en kalibreringsmåler. På dag 52 etter implantering ble dyrene randomisert i tre separate grupper, med tumorvolum på i gjennomsnitt omtrent 300–350 mm³. Se tabell 13 nedenfor. Den første gruppen bestod av

5 fire kontrollmus med et gjennomsnittlig tumorvolum på 312 mm³. To av disse musene ble implantert intravenøst (IV) og to intra-tumor (IT) med henholdsvis 200 µl og 50 µl av en bæremiddelløsning. Den andre gruppen med et

10 gjennomsnittlig tumorvolum på 345 mm³ bestod av fire mus implantert intravenøst med 200 µl HPP-celler pr. mus (2 x 10⁷ celler). Den siste gruppen, implantert IT med 50 µl HPP-celler pr. mus, bestod også av fire mus med et

gjennomsnittlig tumorvolum på 332 mm³.

[0270]

15 Tabell 13: Eksperimentelle grupper for *in vivo*-tumorundertrykkingseksperiment.

Dyr nr.	HPP-behandlingsgruppe	Tumorvolum på dag for HPP-implantering
Gruppe 1 (kontroll)		
1	IV 1	457
2	IT 2	429
3	IT 3	214
4	IV 4	147
	Gj.snitt:	312
Gruppe 2 (IV-celleimplantering)		
5	1	466
6	2	209
7	3	217
8	4	487
	Gj.snitt:	345

Gruppe 3 (IT-celleimplantering)		
9	1	491
10	2	256
11	3	296
12	4	285
	Gj.snitt:	332
IV - 200 µl implantering; IT - 50 µl implantering.		

[0271] På dag 66, 14 døgn etter implantering av HPP-celler ble studien avsluttet på grunn av høye tumorvolum.

5

6.6.2. Resultater

[0272] Tumorvolumene (TV) ble målt inntil dag 66 (dag 14 etter HPP-celleimplantering) når TV for kontrollgruppen nådde et gjennomsnitt på 2921 mm³. IV-behandlingsgruppen ved slutten av studien hadde et gjennomsnittlig TV på 2076 mm³ og IT-gruppen hadde et TV på 2705 mm³. Med hensyn til % økning i TV etter behandling, viste IT-gruppen en moderat 20 % inhibering mens IV-gruppen viste mer enn 35 % inhibering av tumorvekst sammenlignet med kontrollgruppen. Det var demonstrerbar inhibering i It-gruppen. Se FIG. 11.

10

15

Patentkrav

1. Humane nukleerte placentaperfusatceller for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av en tumor hos et individ, der de humane nukleerte perfusatcellene fra placenta omfatter CD56⁺, CD16⁻ intermediære naturlige dreperceller fra placenta og kan oppnås ved perfusjon av human placenta som har blitt tappet for navlestrengblod og skylt for å fjerne gjenværende blod og produsere placentaperfusat omfattende nukleerte placentaceller; og isolering av de nukleerte placentacellene fra placentaperfusatet.
2. De humane nukleerte placentaperfusatcellene for anvendelse ifølge krav 1, der placentaperfusatcellene omfatter minst omtrent 50 % CD56⁺, CD16⁻ intermediære naturlige dreperceller fra placenta som uttrykker ett eller flere microRNA 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 eller hsa-miR-99a ved et registrerbart høyere nivå enn perifere naturlige dreperceller fra blod.
3. De humane nukleerte placentaperfusatcellene for anvendelse ifølge krav 2, der CD56⁺-, CD 16⁻ cellene uttrykker ett eller flere av aminopeptidase N-protein, apolipoprotein E-protein, atrofin-1-interagerende protein 1, inneksin inks-3-protein, integrin alfa-2-prekursorprotein, integrin beta-5-prekursor, mastcelleoverflateglykoprotein GP49B-prekursorprotein eller ryanodinreseptor 1-protein; og der CD56⁺-, CD16⁻ cellene ikke uttrykker ett eller flere av fibroblastvekstfaktorreseptor 4-prekursorprotein, immunitetsforbundet nukleotid 4-lignende protein, integrin alfa-L-prekursorprotein, integrin beta 2-prekursorprotein, integrin beta 4-prekursorprotein, membranbundet lytisk murin transglykosylase D-prekursorprotein, oksysterolbindende protein-relatert protein 8 eller perforin 1-prekursorprotein.
4. De humane nukleerte placentaperfusatcellene for anvendelse ifølge krav 1, der perfusatcellene anvendes i et forhold på omtrent 5 perfusatceller pr. tumorcelle.
5. De humane nukleerte placentaperfusatcellene for anvendelse ifølge krav 1, der perfusatcellene anvendes i et forhold på omtrent 10 perfusatceller pr. tumorcelle.

6. De humane nukleerte placentaperfusatcellene for anvendelse ifølge kravene 1 til 5, der tumoren er blodkreft, eller der tumoren er en solid tumor, eller hvor tumoren er et primært duktalt karsinom, leukemi, akutt T-celleleukemi, kronisk myeloid lymfom (CML), akutt myelogen leukemi, kronisk myelogen leukemi (CML), lungekarsinom, kolonadenokarsinom, histocyttylmyfom, myelomatose, kolorektalt karsinom, kolorektalt adenokarsinom eller retinoblastom.

7. Humane CD56⁺, CD16⁻ intermediære naturlige dreperceller fra placenta for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av en tumor hos et individ, der intermediære naturlige dreperceller fra placenta uttrykker ett eller flere microRNA 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 eller hsa-miR-99a ved et registrerbart høyere nivå enn naturlige dreperceller fra perifert blod.

8. De humane CD56⁺, CD16⁻ intermediære naturlige dreperceller fra placenta for anvendelse ifølge krav 7, der intermediære naturlige dreperceller fra placenta settes i kontakt med en immunmodulerende forbindelse i en mengde og i et tidsrom tilstrekkelig for de naturlige intermediære drepercellene fra placenta til å uttrykke registrerbart mer granzym B enn et ekvivalent antall intermediære naturlige dreperceller fra placenta som ikke har vært i kontakt med den immunmodulerende forbindelsen, der den immunmodulerende forbindelsen er lenalidomid eller pomalidomid.

9. De humane CD56⁺, CD16⁻ intermediære naturlige dreperceller fra placenta for anvendelse ifølge krav 7, der intermediære naturlige dreperceller fra placenta settes i kontakt med en immunmodulerende forbindelse i en mengde og i et tidsrom tilstrekkelig for de naturlige intermediære drepercellene fra placenta til å vise registrerbart høyere cytotoxiskitet mot tumorcellene enn et ekvivalent antall intermediære naturlige dreperceller fra placenta som ikke har vært i kontakt med den immunmodulerende forbindelsen, der den immunmodulerende forbindelsen er lenalidomid eller pomalidomid.

10. De humane CD56⁺, CD16⁻ intermediære naturlige drepercellene fra placenta for anvendelse ifølge krav 8 eller 9, der de naturlige intermediære drepercellene fra placenta uttrykker ett eller flere av BAX, CCL5, CD68, CD8A,

CSF2, FAS, GUSB eller IL2RA ved et høyere nivå enn et ekvivalent antall naturlige intermediære dreperceller fra placenta som ikke har vært i kontakt med lenalidomidet eller pomalidomidet.

5 11. De humane CD56⁺, CD16⁻ intermediære naturlige drepercellene fra placenta for anvendelse ifølge krav 8 eller 9, der de naturlige intermediære drepercellene fra placenta uttrykker ett eller flere av BAX, CCL2, CCL3, CCL5, CSF1, CSF2, ECE1, FAS, GNLY, GUSB, GZMB, IL1A, IL2RA, IL8, IL10, LTA, PRF1, PTGS2, SKI eller TBX21 ved et høyere nivå enn et ekvivalent antall
10 naturlige intermediære dreperceller fra placenta som ikke har vært i kontakt med lenalidomidet eller pomalidomidet.

12. De humane CD56⁺, CD16⁻ naturlige intermediære naturlige drepercellene for anvendelse ifølge kravene 7 til 11, der tumoren er blodkreft, eller der tumoren er en
15 solid tumor, eller hvor tumoren er et primært duktalt karsinom, leukemi, akutt T-celleleukemi, kronisk myeloid lymfom (CML), akutt myelogen leukemi, kronisk myelogen leukemi (CML), lungekarsinom, kolonadenokarsinom, histocyttylmfom, myelomatose, kolorektalt karsinom, kolorektalt adenokarsinom eller retinoblastom.

20 13. Kombinerte naturlige dreperceller for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av en tumor hos et individ, der de kombinerte naturlige drepercellene omfatter CD56⁺, CD16⁻ intermediære naturlige dreperceller fra placenta isolert fra placentaperfusat og naturlige dreperceller isolert fra navlestrengblod fra placentaen som placentalperfusatet er tatt fra, og der de
25 naturlige intermediære drepercellene fra placenta uttrykker ett eller flere av mikroRNA 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 eller hsa-miR-
30 99a ved et registrerbart høyere nivå enn naturlige dreperceller fra perifert blod.

14. De humane CD56⁺, CD16⁻ placentale intermediære naturlige drepercellene for anvendelse ifølge krav 7 eller de kombinerte naturlige drepercellene for anvendelse ifølge krav 13, hvor disse intermediære naturlige drepercellene omfatter:
35 et registrerbart høyere antall CD3⁻CD56⁺CD16⁻ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod;

- et registrerbart lavere antall $CD3^-CD56^+CD16^+$ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod;
- et registrerbart høyere antall $CD3^-CD56^+KIR2DL2/L3^+$ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod;
- 5 et registrerbart lavere antall $CD3^-CD56^+NKp46^+$ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod;
- et registrerbart høyere antall $CD3^-CD56^+NKp30^+$ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod;
- 10 et registrerbart høyere antall $CD3^-CD56^+2B4^+$ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod; eller
- et registrerbart høyere antall $CD3^-CD56^+CD94^+$ naturlige dreperceller enn et ekvivalent antall naturlige dreperceller fra perifert blod.
- 15 15. De kombinerte naturlige drepercellene for anvendelse ifølge kravene 13 til 14, hvor tumoren er blodkreft, eller hvor tumoren er en solid tumor, eller hvor tumoren er et primært duktalt karsinom, leukemi, akutt T-celleleukemi, kronisk myeloid lymfom (CML), akutt myelogen leukemi, kronisk myelogen leukemi (CML), lungekarsinom, kolonadenokarsinom, histocyttylmyfom, myelomatose, kolorektalt karsinom, kolorektalt adenokarsinom eller retinoblastom.

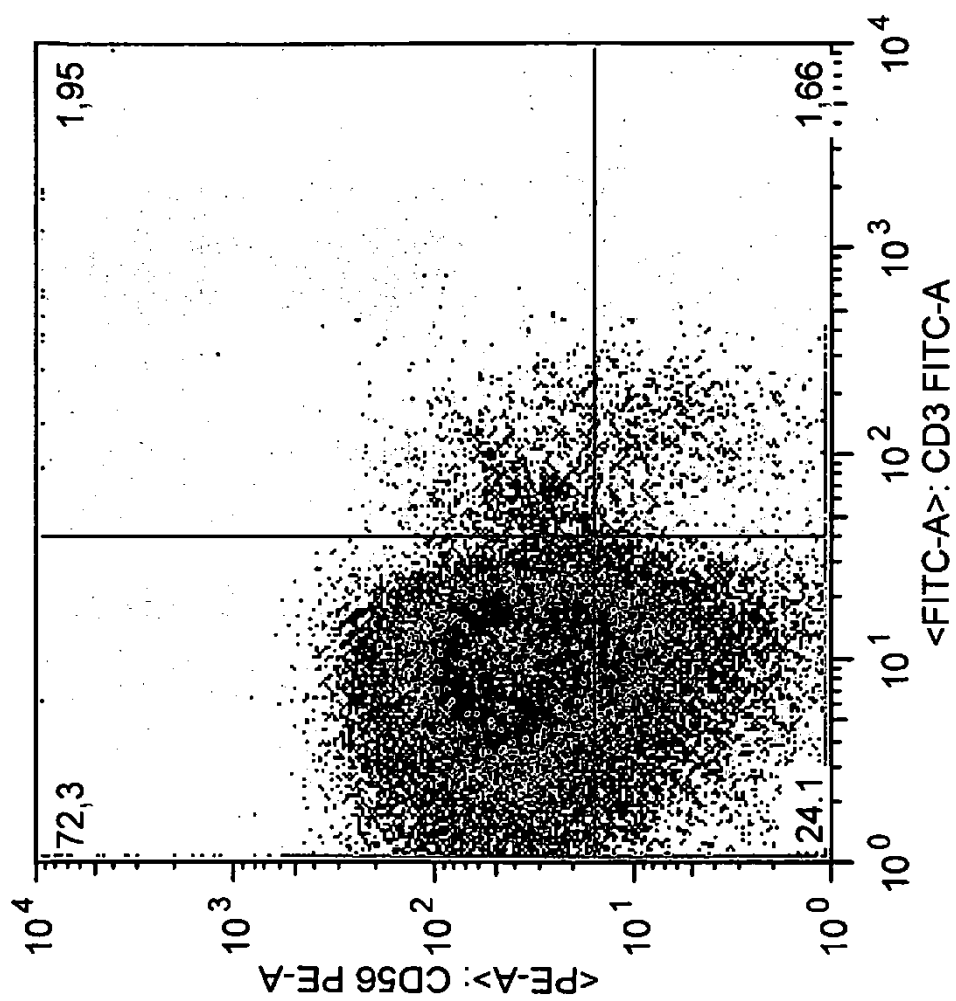


FIG. 1

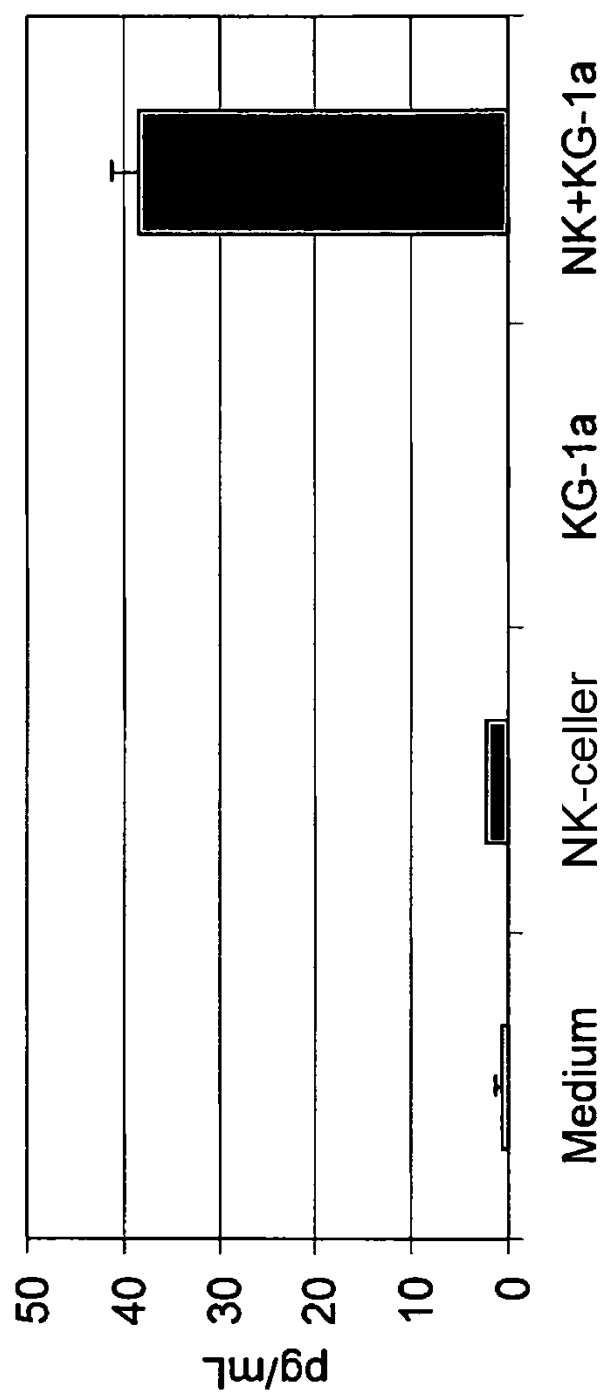


FIG. 2A

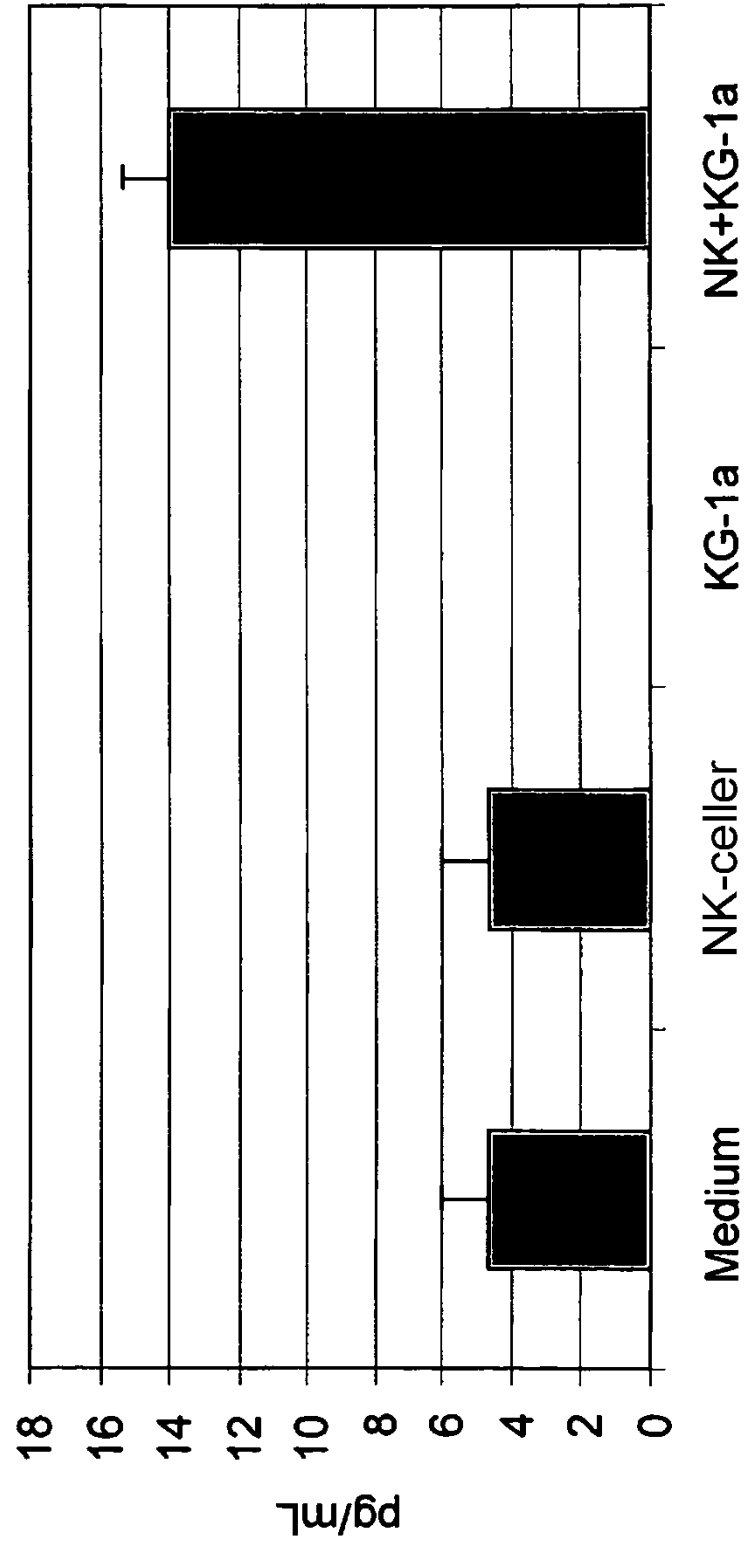


FIG. 2B

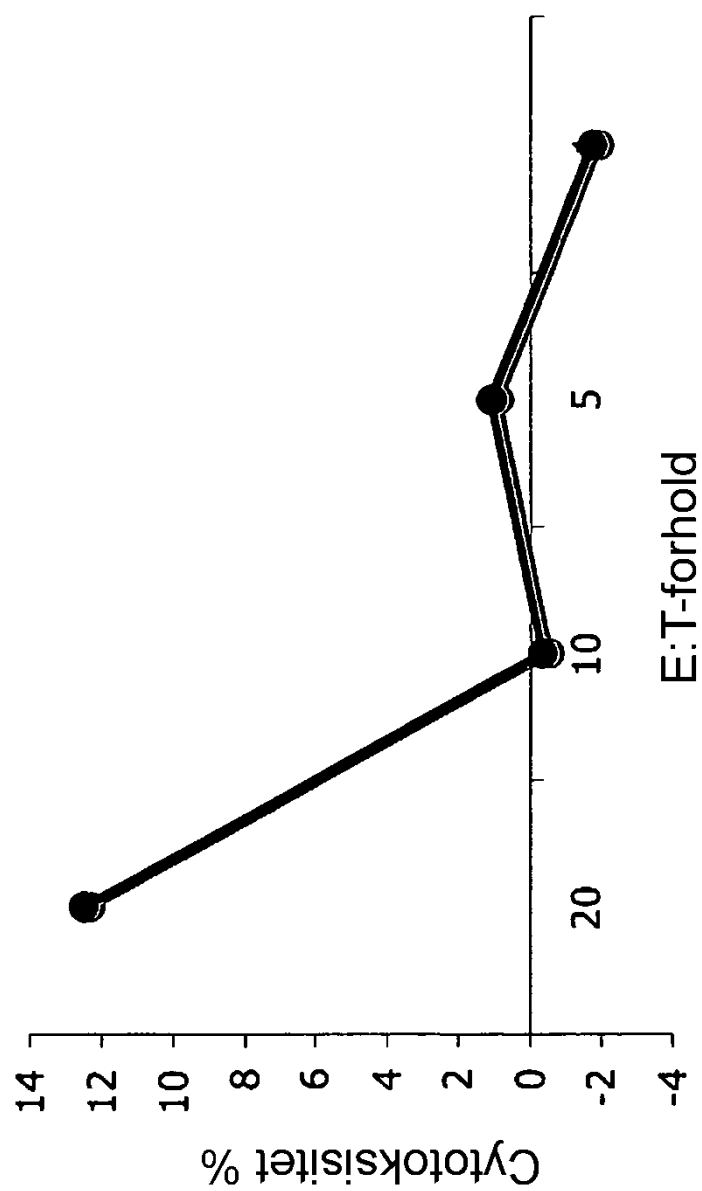


FIG. 3

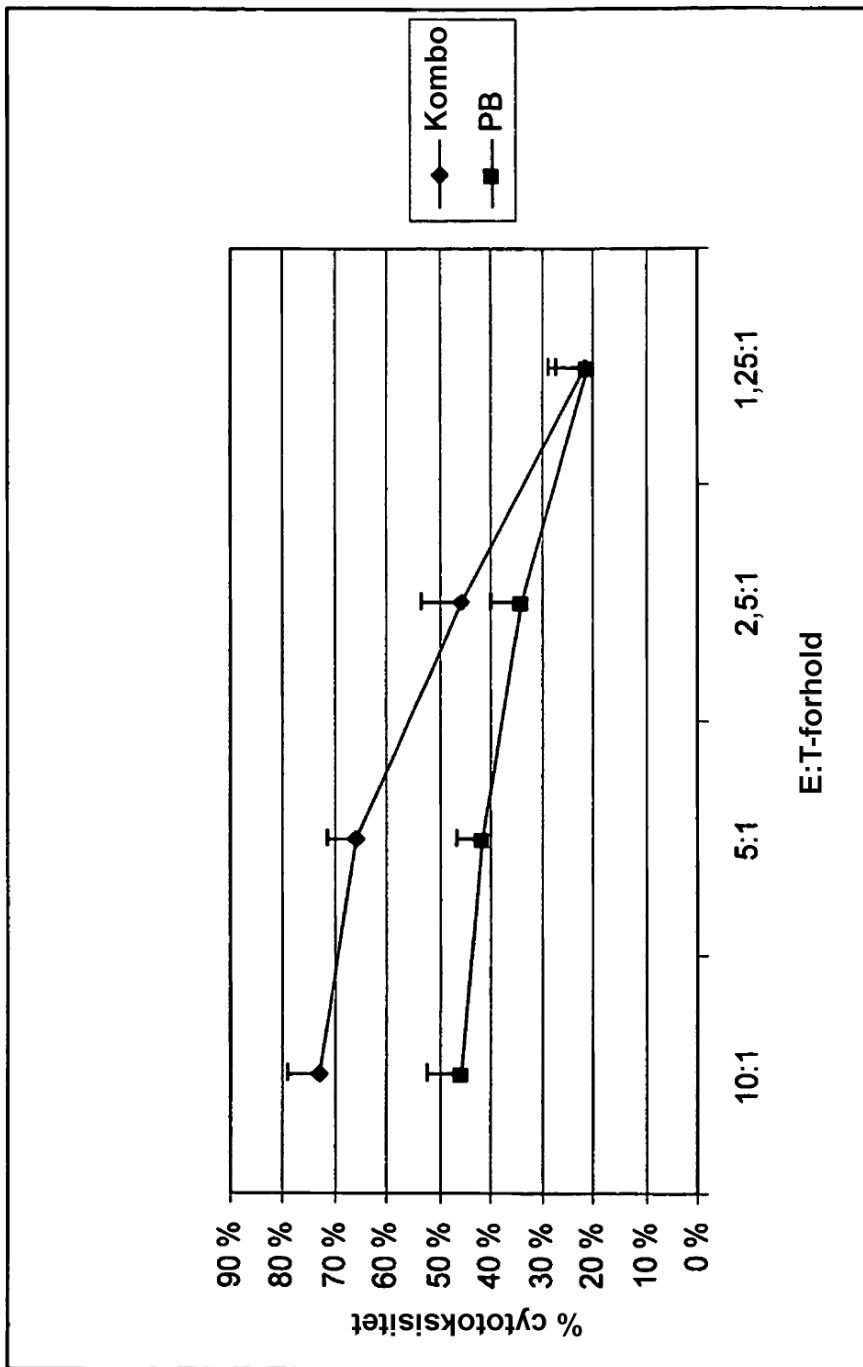


FIG. 4

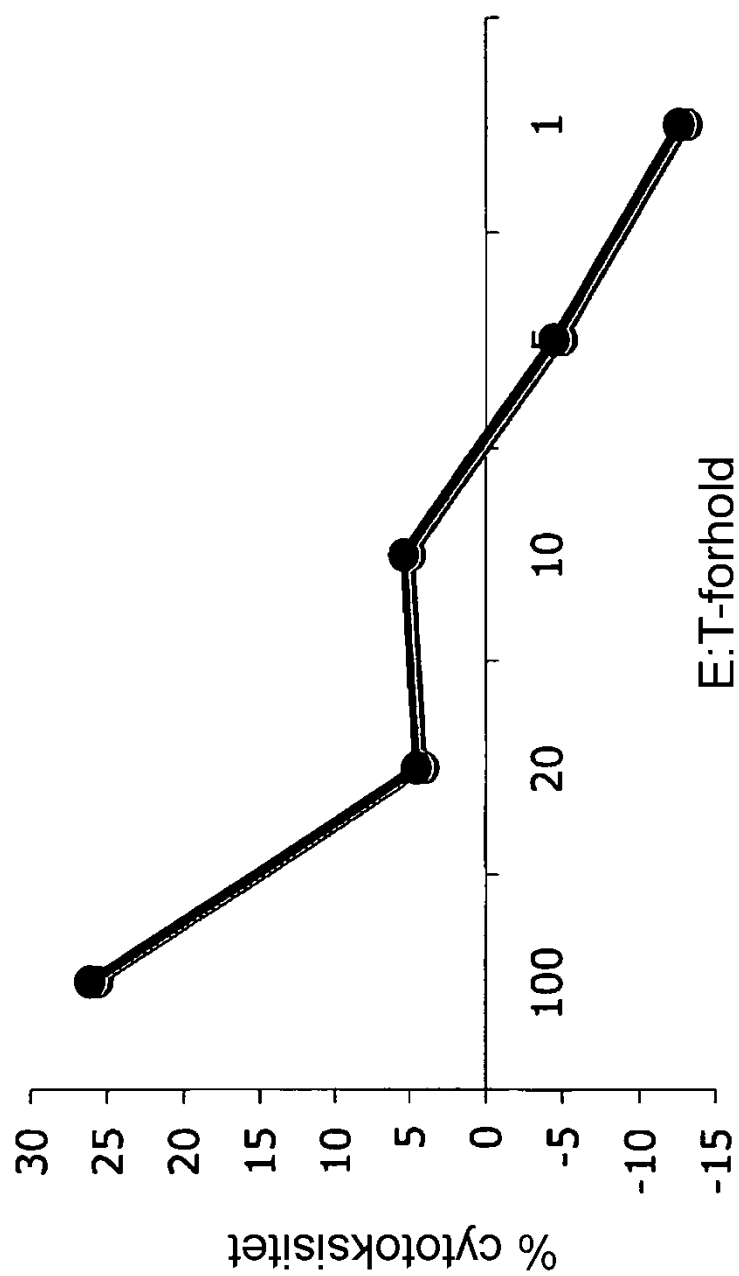
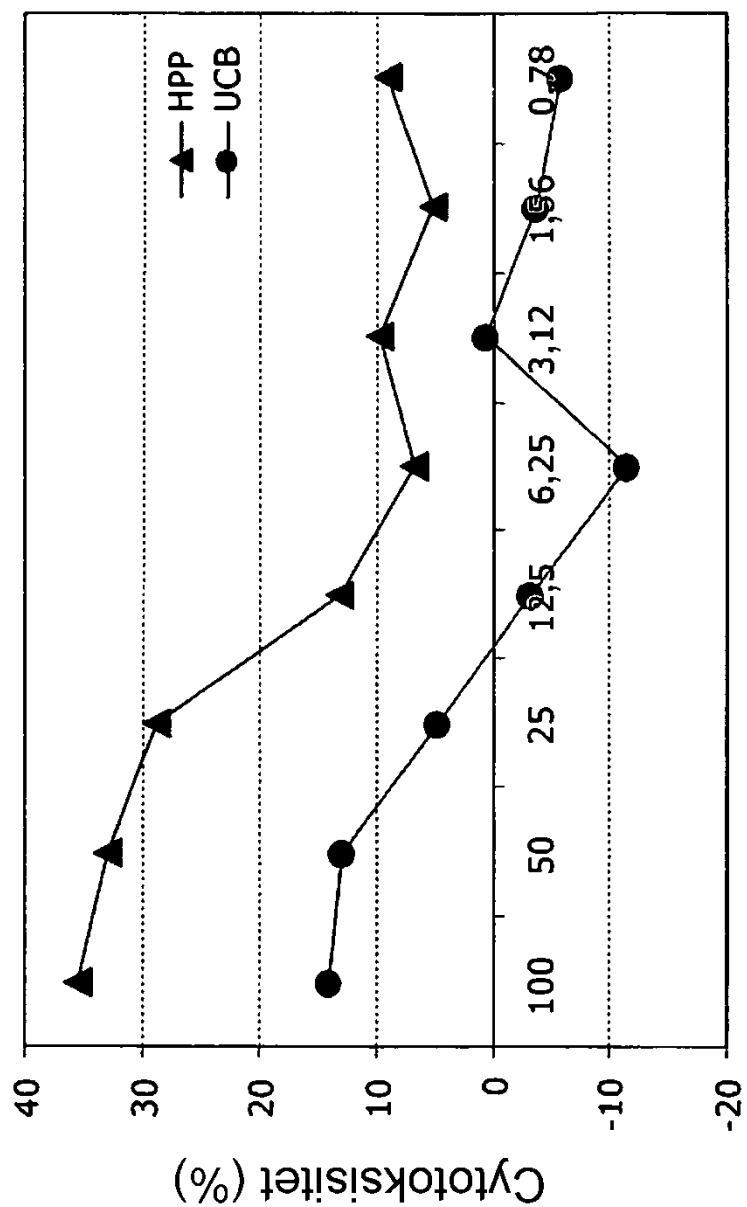


FIG. 5



Effektor: Mål

FIG. 6

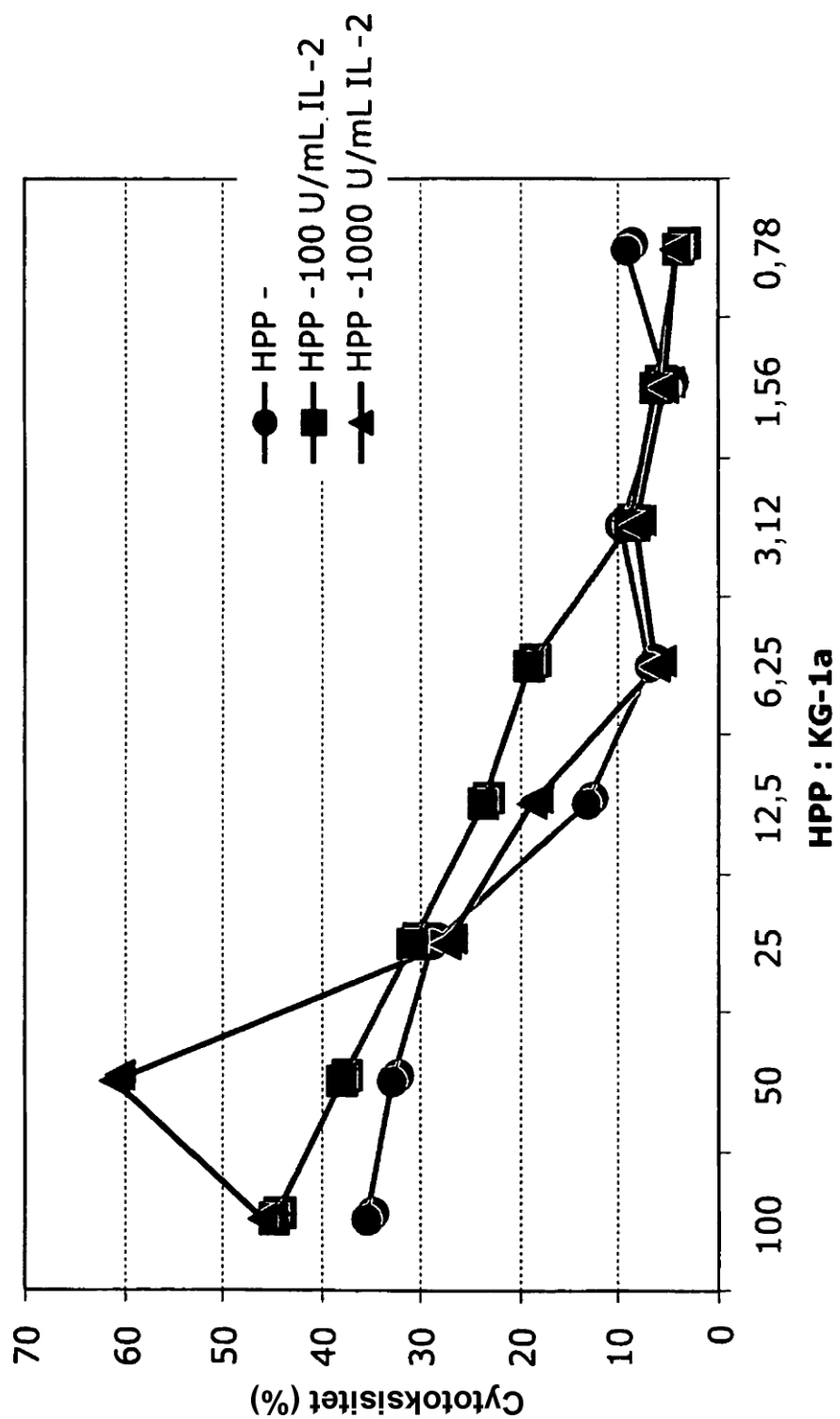
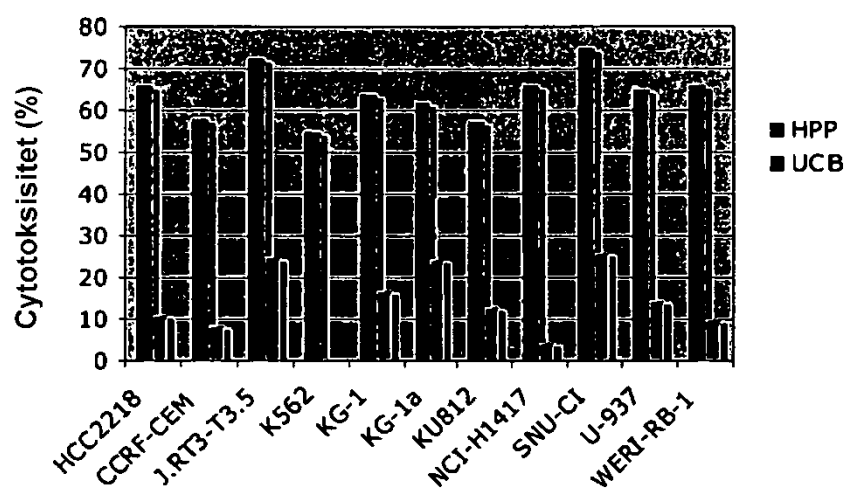
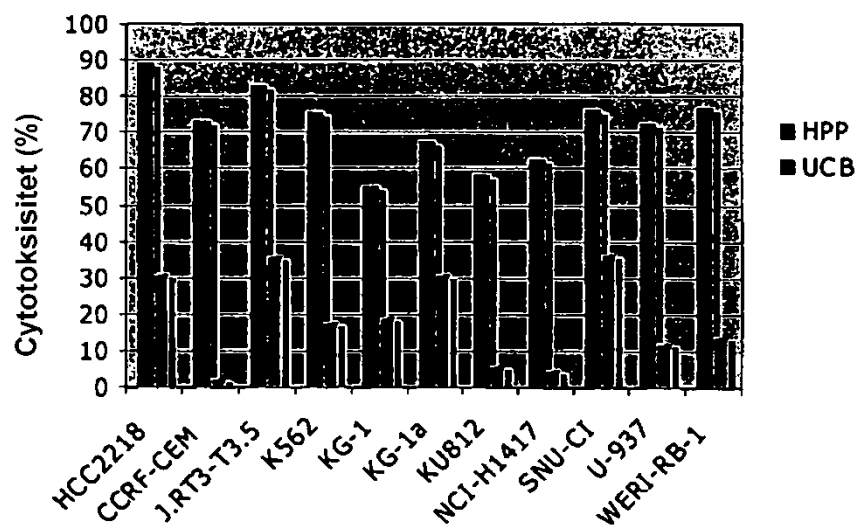


FIG. 7

A



B



FIGS. 8A, 8B

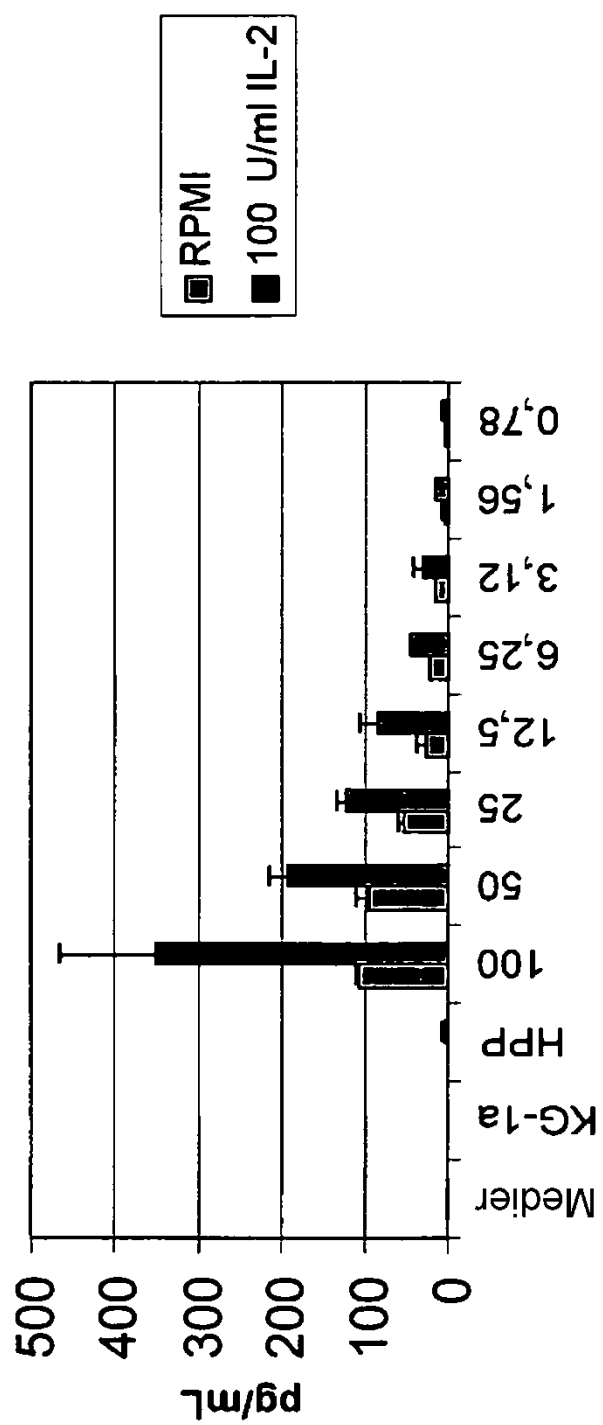
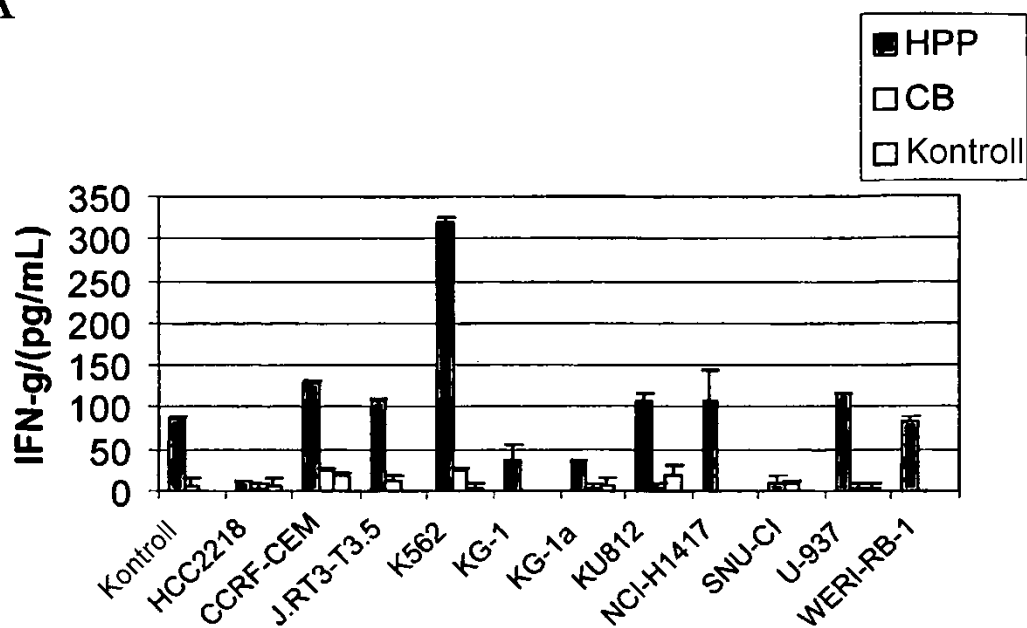
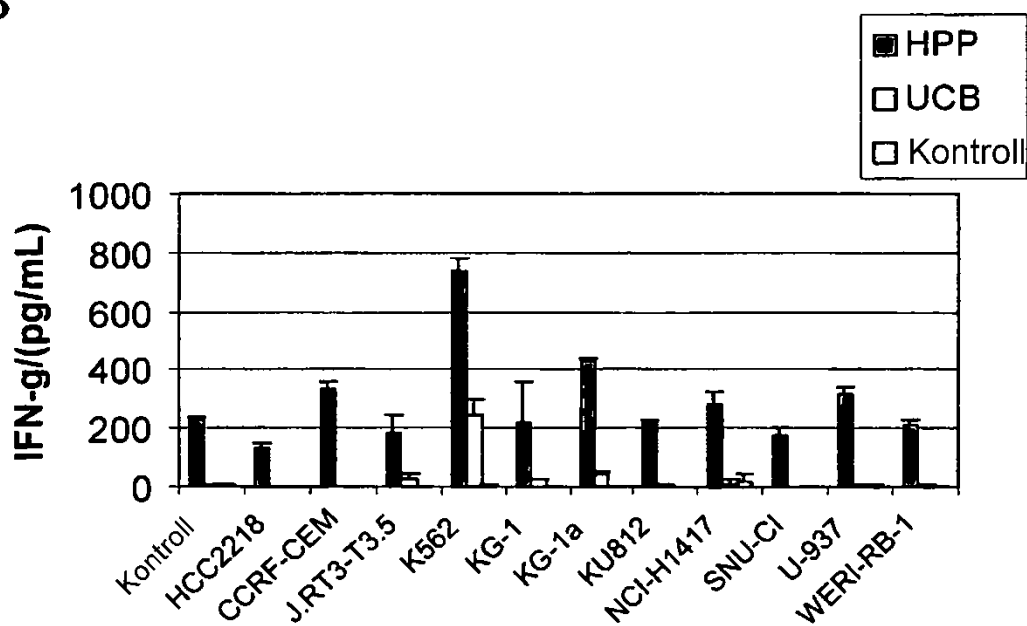


FIG. 9

A



B



FIGS. 10A, 10B

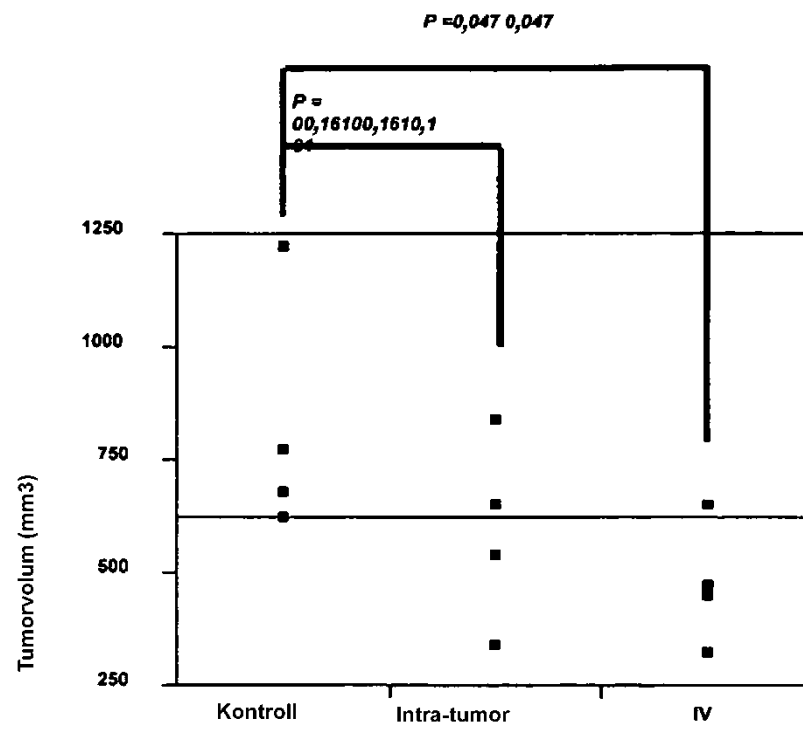


FIG. 11